

**Charakterisierung der Expression und Funktion von BPI  
(*Bactericidal/Permeability Increasing Protein*) basierend auf neu  
entwickelten Mausmodellen.**

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES  
DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)  
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von  
Nicole Bezold, 20.06.1986

aus  
Kötzting

im Jahr  
2015

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:  
Datum

Die Arbeit wurde angeleitet von:  
Prof. Dr. Dr. André Gessner

Unterschrift:

Für meine Familie

*Leicht ist das Leben für keinen von uns. Doch was nützt das, man muss Ausdauer haben und vor allem Vertrauen zu sich selbst. Man muss daran glauben, für eine bestimmte Sache begabt zu sein, und diese Sache muss man erreichen, koste es, was es wolle.*

Marie Curie (1867 - 1934)



## Danksagung

Als Erstes möchte ich mich herzlichst bei meinem Erstgutachter und Betreuer Herrn Prof. Dr. Dr. André Gessner für die Überlassung der interessanten und herausfordernden Themen, sowie für seine Unterstützung, den fachlichen Rat und die von ihm gewährte Freiheit in der Planung und Durchführung von Experimenten bedanken.

Mein besonderer Dank gilt zudem Herrn Prof. Dr. Thomas Hehlhans für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens. Bei Herrn Prof. Dr. Reinhard Sterner möchte ich mich für seinen Einsatz als Drittprüfer, seitens der Naturwissenschaftlichen Fakultät der UR bedanken. Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Richard Warth, für den Vorsitz des Prüfungsausschusses und Prof. Dr. Gunter Meister, für seine Bereitschaft als Ersatzprüfer zu fungieren.

Auch all unseren Tierpflegern der zentralen Tierlaboratorien der Universität möchte ich ein großes Dankeschön aussprechen, für die exzellente Versorgung meiner Mäuse und ihre große Hilfsbereitschaft.

Bei allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern der AG Gessner möchte ich mich ebenfalls herzlich für die freundschaftliche, hilfsbereite und oftmals auch sehr lustige Stimmung im Labor und Büro bedanken. Die Arbeit mit euch allen hat mir wirklich sehr viel Freude bereitet.

Im Besonderen möchte ich dabei noch...

... Alexandra, Lisa und Nadja für die großartige Unterstützung bei den gemeinsam durchgeführten *in vivo* Infektionen, die ohne euch nicht möglich gewesen wären ...

... Martina Toelge für die vielen, oft ellenlangen Luminex-Messungen/Auswertungen ...

... Joachim Gläsner für die fachlichen Hilfestellungen ...

... dem kompletten „Mikrobiom-Team“ und hierbei besonders Andreas Hiergeist für die nette und kompetente Hilfe ...

... ein ganz großes Dankeschön aussprechen.

Weiterhin möchte ich mich bei meiner gesamten Familie für den Rückhalt während dieser oftmals nicht ganz einfachen Zeit bedanken. Dabei danke ich besonders meinen Eltern für ihre moralische aber auch finanzielle Unterstützung, die mir das Studium erst ermöglicht hat.



## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	7
1. Einleitung .....	11
1.1 Das Immunsystem .....	11
1.1.1 Das angeborene Immunsystem.....	12
1.1.2 TLR-4 und LPS-Erkennung.....	13
1.1.3 Oberflächenepithelien und antibakterielle Peptide.....	14
1.2 Das Darmmikrobiom .....	15
1.3 Das Bactericidal/Permeability Increasing Protein (BPI).....	16
1.3.1 Struktur und Funktion von BPI.....	16
1.3.2 Die Rolle von BPI bei bakteriellen Infektionen der Atemwege.....	18
1.3.3 Die Rolle von BPI bei Erkrankungen des Verdauungstraktes.....	19
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit.....	20
2. Material und Methoden .....	22
2.1 Material .....	22
2.1.1 Antikörper.....	22
2.1.2 Arbeitsgeräte.....	23
2.1.3 Bakterienstämme, Plasmide und Zelllinien.....	24
2.1.4 Chemikalien .....	25
2.1.5 Enzyme .....	27
2.1.6 Kommerziell erhältliche Systeme.....	27
2.1.7 Molekulargewichtsstandard.....	28
2.1.8 Nährmedien.....	28
2.1.9 Oligonukleotide.....	29
2.1.10 Puffer und Lösungen .....	32
2.1.11 Stimulantien .....	32
2.1.12 Verbrauchsmaterialien .....	33
2.1.13 Versuchstiere.....	34

## Inhaltsverzeichnis

2.2 Methoden.....	35
2.2.1 Anzucht von Bakterien .....	35
2.2.2 Auftrennung von DNA-Gemischen mittels Agarose-Gelelektrophorese .....	35
2.2.3 Bestimmung der Bakterienlast aus BAL-Flüssigkeit und Gewebekomogenat ...	36
2.2.4 Bronchoalveoläre Lavage (BAL).....	36
2.2.6 Differenzierung von ER-Hoxb8-Stammzellen zu Neutrophilen.....	37
2.2.7 DiffQuik-Färbung.....	38
2.2.8 Durchflusszytometrie.....	38
2.2.9 Einfrieren und Auftauen von ER-Hoxb8-Zellen.....	39
2.2.10 Enzyme-linked Immunosorbant Assay (ELISA) .....	39
2.2.11 Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	40
2.2.12 Fibronectinbeschichtung von Zellkulturplatten .....	40
2.2.13 Generierung und Kultivierungsbedingungen von ER-Hoxb8-Stammzellen.....	40
2.2.14 Gewebeaufschluss für Luminex-Proteinbestimmungen.....	41
2.2.15 Gewinnung von Blut- und Serumproben .....	41
2.2.16 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien.....	41
2.2.17 Histopathologische Begutachtung von Kolonpräparaten .....	42
2.2.18 Immunfluoreszenzmikroskopie .....	42
2.2.19 Induktion einer akuten oder chronischen Kolitis .....	43
2.2.20 Intratracheale Infektionen .....	43
2.2.21 Isolation und Kultivierung von Knochenmarksstammzellen .....	43
2.2.22 Kultivierungsbedingungen für CHO-Zellen.....	44
2.2.23 Kultivierungsbedingungen für Phoenix-Zellen.....	44
2.2.24 Luminex-xMAP®-Technologie .....	45
2.2.25 LPS-induzierte Regulation von BPI und LBP.....	46
2.2.26 Next Generation Sequencing.....	46
2.2.27 Organentnahme bei Versuchstieren .....	53
2.2.28 pGEM-Teasy Vektor System.....	54
2.2.29 Plasmid-DNA Isolierung aus Bakterien.....	54



## Inhaltsverzeichnis

2.2.30 Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> , PCR) .....	55
2.2.31 Produktion von rekombinantem SCF ( <i>stem cell factor</i> ) .....	55
2.2.32 Quantitative Echtzeit-PCR ( <i>quantitative real-time PCR</i> , qPCR) .....	55
2.2.33 Retrovirale Transduktion – Infektion von Knochenmarkszellen .....	56
2.2.34 RNA-Präparation und cDNA-Synthese.....	56
2.2.35 Statistische Auswertungen.....	57
2.2.36 Stimulation von T-Zellen aus mesenterialen Lymphknoten.....	57
2.2.37 Stimulation von neutrophilen Granulozyten.....	57
2.2.38 Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> .....	58
3. Ergebnisse .....	59
3.1 Charakterisierung der für BPI und LBP humanisierten Mauslinie – Regulationsmechanismen und Konzentrationsverhältnisse von BPI und LBP .....	59
3.1.1 Basales Expressionsmuster von BPI und LBP auf mRNA- und Protein-Ebene ..	60
3.1.2 Expressionsregulation von BPI und LBP im zeitlichen Verlauf nach Infektionen .....	62
3.1.3 Expression von humanem BPI in neutrophilen Granulozyten .....	64
3.1.4 Freisetzung von BPI aus neutrophilen Granulozyten.....	65
3.2 Untersuchung der BPI-Expressionsregulation an immortalisierten Knochenmarksstammzelllinien .....	68
3.2.1 Generierung von ER-Hoxb8 immortalisierten Stammzelllinien .....	69
3.2.2 Differenzierung von ER-Hoxb8 Stammzellen zu neutrophilen Granulozyten....	72
3.2.3 Untersuchung der BPI-Expression in Hoxb8-Neutrophilen.....	74
3.2.4 Stimulation von ER-Hoxb8-Neutrophilen .....	76
3.3 Infektion BPI-defizienter und für BPI oder BPI und LBP humanisierter Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren .....	77
3.3.1 Der genetische Maushintergrund wirkt sich auf den Verlauf von akuten Lungeninfektionen mit grampositiven und gramnegativen Erregern aus.....	78
3.3.2 Die Rolle von BPI bei pulmonalen Infektionen und Entzündungsgeschehen ....	81
3.4 Untersuchung der Darm-Mikrobiota der verschiedenen Mauslinien.....	93

## Inhaltsverzeichnis

3.4.1 C57BL6/N und C57BL6/J Mauslinien weisen eine abweichende Suszeptibilität im DSS-Modell und eine unterschiedliche Zusammensetzung des Darmmikrobioms auf .....	93
3.4.2 Die Rolle von BPI im Modell der Dextransulfat-induzierten Kolitis .....	98
3.4.3 BPI beeinflusst die Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms .....	108
4. Diskussion .....	111
4.1 Konzentrationsverhältnisse und Expressionsregulation von BPI und LBP.....	111
4.2 Die Bedeutung des genetischen Hintergrundes in verschiedenen Mausmodellen.	114
4.3 Die Rolle von BPI bei akuten Lungeninfektionen.....	117
4.4 Die Rolle von BPI bei akuten und chronischen Darmentzündungen .....	120
5. Zusammenfassung.....	123
6. Literatur .....	126
7. Anhang.....	134
7.1 Abbildungsverzeichnis .....	134
7.2 Tabellenverzeichnis .....	137
7.3 Lebenslauf .....	138

## 1. Einleitung

### 1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem verteidigt den Körper gegen Infektionen. Die erste Abwehr bildet die angeborene Immunität. Sie kann Krankheitserreger nur über deren konservierte molekulare Strukturen erkennen und bietet keinen gezielten Schutz gegen erneute Infektionen gleicher Art im Sinne eines immunologischen Gedächtnisses. Die adaptive oder erworbene Immunität basiert hingegen auf der klonalen Selektion von Lymphozyten, mit einer Vielzahl hochspezifischer und sehr selektiver Rezeptoren. Antigenspezifische Lymphozyten vermehren sich und differenzieren zu Effektorzellen. Die erworbene Immunantwort bietet zudem durch die Erzeugung von Gedächtniszellen eine schnellere und wirksamere Reaktion auf bekannte Erreger. Um die bestehende Vielfalt von Krankheitserregern erkennen und effektiv bekämpfen zu können, bedarf es unterschiedlichster Erkennungssysteme und Effektormechanismen. Eines der wichtigsten medizinischen Ziele der immunologischen Forschung ist das bessere Verständnis der Regulation dieser Immunantworten. Sie sollten einerseits - wenn unerwünscht - unterdrückt und andererseits zur Vorbeugung von Infektionen gezielt vorstimuliert werden können. Das Immunsystem setzt sich aus einer Reihe verschiedener zellulärer Bestandteile zusammen<sup>1</sup>. Immunreaktionen werden durch Leukozyten ausgelöst und vermittelt. Aus einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle gehen zum einen Lymphozyten, für die angeborene Immunität und zum anderen myeloide Zelllinien, für die angeborene und erworbene Immunität hervor. Zu den Granulozyten gehören neutrophile, eosinophile und basophile Zellen, die im Blut zirkulieren und nach Aktivierung als Effektorzellen an Infektionsherden agieren. Makrophagen differenzieren in Geweben, wo sie die erste Linie der Abwehr bilden. Nach Phagozytose von Bakterien aktivieren Makrophagen im Blut andere phagozytische Zellen, die Neutrophilen. Bei den Lymphozyten werden die zwei Hauptgruppen, B- und T-Lymphozyten unterschieden. Diese reifen in den primären lymphatischen Geweben, dem Knochenmark (B-Lymphozyten) und dem Thymus (T-Lymphozyten). Gereifte Zellen wandern vom Blut zu den peripheren, oder sekundären lymphatischen Organen und über die Lymphgefäße in den Blutkreislauf zurück. Die drei Haupttypen des peripheren lymphatischen Gewebes sind Milz, Lymphknoten und mukosaassoziierte lymphatische Gewebe (MALT). Auf diesem Weg werden verschiedenste Antigene, meist über dendritische Zellen (DCs), an patrouillierende T-Zellen präsentiert und, wenn nötig adaptive Immunreaktion ausgelöst. Hierfür proliferieren und differenzieren T-Zellen zu antigenspezifischen Effektorzellen und B-Zellen zu antikörpersezernierenden Zellen<sup>2</sup>.

## 1. Einleitung

### 1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem besteht aus verschiedenen Komponenten. Die Barrierefunktionen der Körperepithelien verhindern, dass sich Infektionen etablieren, indem sie die Adhäsion der Bakterien verhindern und antimikrobielle Enzyme und Peptide sezernieren. Werden diese durchdrungen stehen Zellen und Moleküle zur Verfügung, die die Erreger eindämmen oder zerstören. Verantwortlich sind dafür Rezeptoren des Immunsystems<sup>3</sup>, die zwischen Oberflächen von Pathogenen und Körperzellen unterscheiden. Einige Rezeptoren, wie beispielsweise der Mannoserezeptor auf Makrophagen, stimulieren die Phagozytose direkt, während andere sezerniert werden und die Phagozytose durch Opsonisierung oder Aktivierung des Komplementsystems<sup>4</sup> stimulieren. Zudem besitzen sie eine wichtige Funktion bei der Signalübertragung für Entzündungsreaktionen, Mobilisierung neuer Effektorzellen oder dem Auslösen adaptiver Immunantworten<sup>1</sup>. Die bekanntesten Vertreter sind hierbei die Toll-Like-Rezeptoren (TLR)<sup>3</sup>. Diese sind zwischen verschiedenen Spezies stark konserviert und dienen der Aktivierung der Immunabwehr über einen Signaltransduktionsweg, der bei den meisten Säugern vorhanden ist. Der Lipopolysaccharidrezeptor<sup>5</sup> und dessen Kopplung an den menschlichen TLR-4<sup>6</sup> erkennt führt zur Erkennung von gramnegativen Krankheitserregern. Der TLR-2 vermittelt die Reaktion auf grampositive Erreger, indem er z.B. Proteoglykane der Bakterien erkennt. Die Verknüpfung von TLR-4 und TLR-2<sup>6</sup> aktiviert einen in der Evolution früh entwickelten Signalweg, der den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B und dadurch eine Reihe von Genen aktiviert, darunter Gene für Zytokine, Chemokine und costimulierende Moleküle, die bei der adaptiven Immunantwort von Bedeutung sind. Wurden eingedrungene Krankheitserreger erkannt, kommt es zur Entzündungsreaktion, die zur Akkumulation von Plasmaproteinen und phagozytierenden neutrophilen Granulozyten an der Infektionsstelle führt. Zu den Plasmaproteinen gehören Komponenten des Komplementsystems, die eine zirkulierende oder humorale angeborene Immunität verleihen. Die aktivierten Effektormechanismen bilden die erste Verteidigungslinie des Körpers, ihre Induktion hat jedoch oftmals einen zweiseitigen Charakter. Die Effekte des TNF- $\alpha$ -Proteins<sup>3</sup> können z. B. bei lokaler Freisetzung positiv, bei systemischer Freisetzung jedoch katastrophal sein, indem ein septischer Schock ausgelöst wird. Alle induzierten Effektormechanismen werden durch Rezeptorsysteme gesteuert. So führt die Freisetzung von entzündungsfördernden Chemokinen und Zytokinen, über selektive Rezeptoren zur Rekrutierung von Phagozyten, vor allem neutrophilen Granulozyten, zum Infektionsherd. Darüber hinaus werden Fieber und die Produktion von Akute-Phase-Proteinen induziert. Die Erkennung viraler Krankheitserreger führt zur Produktion von Interferonen, die die Virusreplikation hemmen und T- und NK-Zellen aktivieren. Zytokine, Chemokine, Phagozyten und NK-Zellen sind nicht nur essentiell bei der angeborenen Immunantwort, sondern spielen auch eine zentrale Rolle für die adaptiven Immunantwort<sup>1,2</sup>. Die angeborene Immunität dient der Verhinderung und frühen

## 1. Einleitung

Bekämpfung von Infektionen, reicht sie alleine dafür nicht aus, bereitet sie der adaptiven oder erworbenen Immunantwort den Weg.

### 1.1.2 TLR-4 und LPS-Erkennung

Lipopolysaccharide (LPS) sind Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien, welche eine gravierende systemische Reaktion, den septischen Schock, auslösen können. Das LPS-bindende Protein (LBP) <sup>7</sup> ist ein Akute-Phase-Protein, dass LPS in Körperflüssigkeiten bindet. Sowohl LBP als auch CD14 enthalten wiederholte Leucin-reiche Strukturmotive. Der entstandene Komplex aus LPS und LBP bindet an CD14, das entweder frei im Plasma oder über einen Phosphoinosit-Glykolipid-Schwanz an die Zelloberfläche von Phagozyten gebunden vorkommt<sup>5</sup>. Diese Bindung an Zelloberflächen löst eine Zellantwort aus. Durch die Untersuchung von Mäusen, die genetisch bedingt nicht auf LPS reagieren, aber keine Defekte bei CD14 und LBP aufweisen, wurde das verantwortliche Gen, für die Antwort auf LPS entdeckt. Bei diesen Mäusen war das Gen für den TLR-4 durch Mutationen inaktiviert<sup>8</sup>. Es wurde festgestellt, dass TLR-4 an den CD14:LBP:LPS-Komplex über eine Leucin-reiche Region in der extrazellulären Domäne von CD14 bindet. Die Empfindlichkeit auf LPS wird im Experiment häufig durch die Induktion eines septischen Schocks getestet. Dieser ist die Folge einer übermäßigen Freisetzung von Zytokinen, vor allem von TNF- $\alpha$ . Neben dieser unerwünschten Folge von TNF- $\alpha$ , zeigt sich dessen positive Wirkung bei mutierten Mäusen, denen die TLR-4-Funktion fehlt. Resistent gegenüber einem septischen Schock, sind die Tiere aber hoch anfällig gegenüber LPS-tragenden Pathogenen. Eine Mutation im TLR-4-Gen lässt sich auch bei einigen Patienten, mit unkontrollierten Infektionen mit gramnegativen Bakterien, beobachten. Jedoch ist diese Mutation nur bei wenigen Patienten nachweisbar<sup>9</sup>, was auf andere spezifische Defekte hinweist, die ebenfalls Reaktionen auf gramnegative Pathogene verhindern<sup>10</sup>. Letztendlich führt die Bindung von TLR-4 an den CD14:LBP:LPS-Komplex zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B<sup>11</sup>. Durch Ligandenbindung an die extrazelluläre Domäne des TLR, wird die zytoplasmatische Domäne, die sogenannte TIR-Domäne, veranlasst an das Adaptorprotein MyD88 zu binden und dieses zu aktivieren. Über Protein-Protein-Wechselwirkungen interagiert die Todesdomäne von MyD88 mit IRAK (*IL-1R-associated kinase*), einer Serin/Threonin-Kinase der angeborenen Immunität. Diese löst eine Signalkaskade aus, die zur Aktivierung der Kinasen I $\kappa$ B $\alpha$  und I $\kappa$ B $\beta$  führt. Durch Dimerisierung der beiden wird das inhibitorische Protein I $\kappa$ B phosphoryliert, dissoziiert vom Komplex mit NF $\kappa$ B und wird proteosomal abgebaut. Frei gewordenes NF $\kappa$ B transloziert in den Zellkern, bindet an verschiedene Promotoren und führt zur Aktivierung von Genen der adaptiven Immunantwort und der Sekretion proinflammatorischer Zytokine<sup>12</sup>. Neben der TLR-4-vermittelten Erkennung gramnegativer Bakterien, führt auch die Wechselwirkung grampositiver Bakterien mit TLR-2 zur Aktivierung von NF $\kappa$ B. Zellen des angeborenen Immunsystems sind in der Lage

## 1. Einleitung

Infektionen auch über Bindung an bakterielle Peptide, die N-Formylmethionin (fMet) enthalten, zu erkennen<sup>13</sup>. Alle von Prokaryoten synthetisierten Proteine beginnen mit dieser modifizierten Aminosäure. Der Rezeptor, zur Erkennung von fMet wird als fMet-Leu-Phe-(fMLP)-Rezeptor<sup>14</sup> bezeichnet. Somit existieren neben dem klassischen Signalübertragungsweg über NFκB noch weitere Signalmechanismen, die zur Eindämmung bakterieller Infektionen beitragen.

### 1.1.3 Oberflächenepithelien und antibakterielle Peptide

Die vorderste Front der Immunabwehr wird durch die Oberflächenepithelien des Körpers, die antimikrobiellen Peptide und Proteine, sowie durch Makrophagen und neutrophile Zellen gebildet<sup>15</sup>. Über äußere und innere Epitheloberflächen kommt es zum Kontakt mit Mikroorganismen. Hierbei bieten die Schleimhäute des Atmungsepithels den Eintrittsweg für Mikroorganismen, die durch die Luft übertragen werden und der Verdauungstrakt für Organismen aus Nahrungsmitteln und Wasser. Oberflächenepithelien müssen somit eine schützende Barriere bilden und nach Verletzungen schnell repariert werden. Diese physische Barriere zwischen den Epithelzellen wird durch feste Zell-Zell-Verbindungen (*tight junctions*) gebildet. Zur Infektion kommt es, wenn Krankheitserreger diese Schranke durchdringen. Dies gelingt Pathogenen, indem sie sich zunächst an Oberflächenepithelien anheften und diese besiedeln. Die spezifische Anheftung ermöglicht es ihnen Epithelzellen zu infizieren, zu schädigen und so durch das Epithel zu gelangen. Durch die Anheftung verhindern Krankheitserreger, dass sie durch Luft- oder Flüssigkeitsströme abgetragen werden. Innere Epithelien werden als Schleimhautepithelien bezeichnet, da sie in der Lage sind eine viskose Flüssigkeit, den so genannten Mukus, zu bilden, welcher zahlreiche Glykoproteine, die Mucine enthält. Mikroorganismen in den Atemwegen, wegen beispielsweise durch den ständigen Fluss des Mukus und das Schlagen der Epithelzilien nach außen transportiert. Die Wirksamkeit dieser Infektionsbekämpfung wird bei Patienten mit einem Defekt in der Schleimbildung, oder Hemmung der Zilienbewegung deutlich<sup>16</sup>. Sie entwickeln häufig Infektionen der Lunge, ausgelöst durch eine Besiedlung mit Bakterien. Im Darm<sup>16</sup> ist die so genannte Peristaltik der Mechanismus, mit dem nicht nur die Nahrung sondern auch infektiöse Organismen weiter transportiert werden. Beim Versagen der Peristaltik tritt häufig eine Überhandnahme der Bakterien im Darmlumen auf. Zusätzlich zu den mechanischen Schutzmechanismen produzieren Epithelien verschiedene Substanzen, die Pathogene direkt abtöten oder deren Vermehrung hemmen. Ein Beispiel hierfür ist das antibakterielle Enzym Lysozym<sup>17</sup>, das in der Tränenflüssigkeit und im Speichel sezerniert wird. Im Gastrointestinaltrakt sorgen der niedrige pH-Wert im Magen und die Verdauungsenzyme im proximalen Dünndarm für eine Infektionsbarriere. Im weiteren Verlauf des Darms findet man die Paneth-Zellen, die antibakterielle Peptide, die Cryptidine oder Defensine sezernieren. Andere Epithelien, wie die der Haut und Atemwege,

## 1. Einleitung

produzieren die verwandten  $\beta$ -Defensine. Diese zumeist kationischen Peptide sind in der Lage, Bakterien durch Zerstörung der Membranintegrität abzutöten. Neben den genannten Abwehrmechanismen sind die meisten Epithelien durch eine komplexe Mischung nichtpathogener Bakterien (Mikrobiota) besiedelt, mit welcher potentielle Krankheitserreger in Konkurrenz um Nährstoffe und Anheftungsstellen stehen. Die Mikrobiota sind darüber hinaus in der Lage, antimikrobielle Substanzen zu produzieren, wie beispielsweise die Colicine<sup>19</sup>, die von *Escherichia coli* gebildet werden und die Ansiedlung anderer Bakterien verhindern. Eine Störung der durch die Mikrobiota vermittelten Kolonisationsresistenz nach Antibiotikabehandlungen kann zu einer Besiedelung und Infektion mit pathogenen Mikroorganismen führen.

### 1.2 Das Darmmikrobiom

Der menschliche Darm ist mit  $10^{14}$  Mikroben<sup>67</sup> besiedelt, die sowohl essentielle Nährstoffe bereitstellen, Vitamine synthetisieren, Zellstoffe abbauen, als auch die Gefäßneubildung und das Darmnervensystem fördern. Neben diesen positiven Auswirkungen auf die Gesundheit, können diese Bakterien jedoch bei ungünstiger Komposition auch negative Effekte haben und vermutlich sogar chronische Erkrankungen mit verursachen oder fördern<sup>56</sup>. Mögliche Auslöser dafür sind der Einsatz von Antibiotika, Krankheit, Stress, sowie eine ungesunde Ernährung und Lebensstil. All diese Faktoren können zu einer Störung des Darmmikrobioms führen, bei der sich die Komposition der Bakterien für den Wirt ungünstig verändert. Die Besiedlung des Darms mit kommensalen Bakterien beginnt direkt nach der Geburt. Nach etwa einem Jahr stabilisiert sich die Zusammensetzung. Diese ist sowohl von physikalisch-chemischen Faktoren, wie der Motilität, dem pH-Wert und Nährstoffen, als auch von äußeren Faktoren, wie Umwelteinflüssen, Ernährung und Lebensstil abhängig. Unter Normalbedingungen besteht ein Zusammenspiel zwischen Mensch und Bakterien, zum gegenseitigen Nutzen. Die Bakterien nutzen die geschützte, nährstoffreiche Umgebung des Wirts und helfen diesem bei der Verdauung, tragen zur Aufrechterhaltung der Epithelintegrität bei, die Antigene und Pathogene daran hindert, in den Organismus einzudringen und sind nicht zuletzt an der Regulation der Homöostase des Immunsystems beteiligt. Der Darm hält Pathogene anhand von zwei Barrieren auf, einer mechanischen und einer immunologischen. Die mechanische Barriere besteht aus den Epithelzellen und dem darüber befindlichen Mukus. Die Immunologische setzt sich vorrangig aus sekretierten Immunglobulinen und Immunzellen, wie Makrophagen und Neutrophilen zusammen. Kommensale Bakterien tragen vorrangig zur Aufrechterhaltung der Homöostase bei, indem sie mit Pathogenen um Nährstoffe und Anheftungsstellen konkurrieren. Zudem sind sie in der Lage den pH-Wert zu verändern oder toxische Stoffe zu sekretieren. Einer Störung der Mikrobiomzusammensetzung schädliche Folgen für den Organismus haben. Sowohl äußere Faktoren, wie Ernährung, Antibiotikagabe<sup>69</sup>, Einsatz

## 1. Einleitung

von Prä- oder Probiotika, als auch wirtsspezifische Eigenschaften, wie Alter, Gene oder psychische Verfassung, können Anzahl, Diversität und Aktivität der Darmbakterien beeinflussen. Während im gesunden Organismus eine Homöostase herrscht, kann ein Ungleichgewicht zu Erkrankungen führen. Eine gestörte Zusammensetzung des Darmmikrobioms wird mit verschiedensten Symptomen, wie Blähungen, Schmerzen und Durchfall in Verbindung gebracht. Viele Krankheiten, wie die chronisch entzündliche Darmerkrankung (IBD, *inflammatory bowel disease*), Fettleibigkeit, Diabetes, Leber- oder Herz-Kreislauserkrankungen, Krebs und sogar psychiatrische Erkrankungen wie der Autismus oder Depressionen werden mit der Zusammensetzung der Darmmikrobioms in Verbindung gebracht<sup>20</sup>. Zahlreiche Publikationen belegen eine sehr wichtige Rolle der Darmbakterien für die Entwicklung und Funktion des Immunsystems. Bei einer Reihe von Erkrankungen konnten mit Prä- oder Probiotika positive Effekte erzielt werden. Die Einflussnahme auf die Zusammensetzung der Darmmikrobiota stellt potentiell eine attraktive personalisierte Therapiestrategie für eine Vielzahl von Erkrankungen dar<sup>68</sup>. Nach wie vor ist jedoch in den meisten Fällen unklar, ob die Veränderungen im Darmmikrobiom Ursache oder Konsequenz der Krankheit sind. Daher sind noch zahlreiche Studien nötig, um die Rolle des Darmmikrobioms bei der Genese von Erkrankungen eindeutig zu bestimmen.

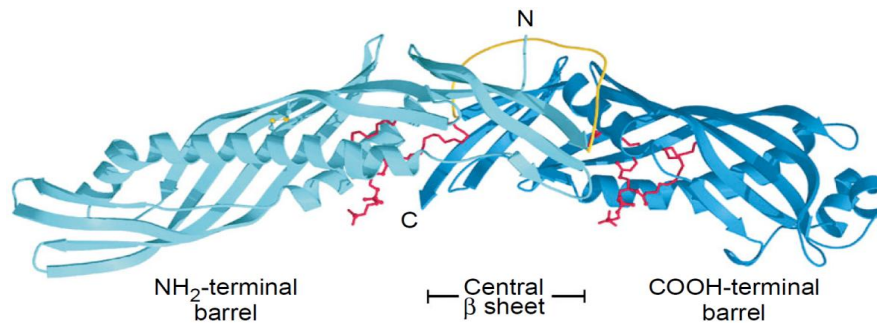
### 1.3 Das Bactericidal/Permeability Increasing Protein (BPI)

#### 1.3.1 Struktur und Funktion von BPI

Das aus humanen neutrophilen Granulozyten isolierte *Bactericidal Permeability Increasing Protein* (BPI) wurde im Jahr 1978 erstmals als ein spezifisch gegen gramnegative Bakterien wirksames antimikrobielles Protein beschrieben<sup>20</sup>. Humanes BPI wird früh während der Myelopoese im Knochenmark von Vorläuferzellen gebildet und dann in großen Mengen Membran-assoziiert in primären Granula von neutrophilen Granulozyten und in geringerem Maße auch in eosinophilen Granulozyten gespeichert<sup>21</sup>. In neueren Arbeiten konnte zudem eine Expression von humanem BPI in mukosalen Epithelzellen des Verdauungstraktes, der Atemwege und des Urogenitaltraktes belegt werden<sup>22</sup>. BPI ist 55-60 kDa groß, hydrophob und weist eine besondere Art von Proteinfaltung auf<sup>23</sup>. Gegenüber anderen löslichen Proteinen mit globulärer Struktur kann die Struktur von BPI als Boomerang bezeichnet werden. Die 456 Aminosäuren teilen sich in zwei Domänen (C-terminal, N-terminal) zu je 200 Aminosäuren auf und sind durch eine Prolin-reiche Linkerregion verbunden<sup>24</sup>. Trotz der unterschiedlichen Aminosäuresequenz der beiden Domänen weisen diese eine ähnliche Sekundär- und Tertiärstruktur von 2  $\alpha$ -Helices und einem  $\beta$ -Faltblatt auf (vgl. Abb. 1) wodurch sich eine Pseudo-Symmetrie ausbildet.



## 1. Einleitung



**Abbildung 1: Kristallstruktur von humanem BPI.**

Schleifendiagramm der Reste 1 bis 145 die die Boomerang-Struktur von BPI verdeutlichen. Phosphatidylcholin-Moleküle in Rot, Linker in Gelb (Beamer, L., Carroll, S. & Eisenberg, D. Crystal Structure of Human BPI and Two Bound Phospholipids at 2.4 Angstrom Resolution. *Science* 276, 1861-1864 (1997)).

Die kationische N-terminale Domäne von BPI vermittelt sowohl die gesamte bakterizide und bakteriostatische Wirkung gegenüber gramnegativen Bakterien als auch die Bindung an den pyrogenen Zellwandbestandteil LPS in einer apolaren Lipidbindetasche. Phospholipide binden primär mit ihren Acyl-Carbon-Ketten und werden über Van-der-Waals Kräfte stabilisiert. Die apolaren Bereiche des Lipids liegen somit im Inneren des Proteins, womit ein Lipidtransport<sup>25</sup> ermöglicht wird. Nach der LPS-vermittelten Bindung von BPI an die äußere Membran von gramnegativen Bakterien erfolgt eine zeitabhängige Penetration der inneren Membran, die zu einem Verlust der Membranintegrität und schließlich zu deren Permeabilisierung führt<sup>26</sup>. Für den C-terminalen Bereich des Proteins wurden opsonisierende Eigenschaften beschrieben, die auf der Rekrutierung von Komplementfaktoren beruhen und zu einer gesteigerten Phagozytose von Bakterien durch Makrophagen und Granulozyten führen. Die bakterizide Wirkung von BPI wird zudem durch Synergie-Effekte mit weiteren antimikrobiellen Proteinen aus der Familie der Defensine und Cathelicidine verstärkt. Das murine Ortholog mit 54 % Sequenzidentität und 63 % Sequenzähnlichkeit zu humanem BPI wurde erst vor wenigen Jahren entdeckt<sup>27</sup>. Im Gegensatz zu humanem BPI wird BPI in der Maus nur in geringen Mengen konstitutiv exprimiert. In Mäusen ist die Transkription besonders stark in den Hoden und Nebenhoden, in geringerem Maße in Knochenmark, neutrophilen Granulozyten und dendritischen Zellen sowie in den lymphatischen Organen Lymphknoten, Thymus und Milz. Erst nach Stimulation über TLR-Liganden findet eine stärkere Expression in Granulozyten und auch in dendritischen Zellen (*dendritic cells*, DCs) des Knochenmarks statt. Die Induktion erfolgt durch LPS über einen TLR4-TRIF-abhängigen Signalweg<sup>28</sup>. Es konnte aufgezeigt werden, dass murines BPI in der Lage ist, LPS zu neutralisieren und LPS-vermittelte Konsequenzen wie NFκB Aktivierung, MAP-Kinasen-Phosphorylierung und die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins TNF (Tumor-Nekrose-Faktor) in Makrophagen zu inhibieren<sup>29</sup>. Die antiinflammatorische Wirkung von murinem und humanem BPI ist ähnlich. Es konnte jedoch bisher kein Effekt von murinem BPI auf die Proliferation der Bakterien

## 1. Einleitung

nachgewiesen werden. Murines BPI scheint daher eine deutlich geringere antimikrobielle Wirkung als humanes BPI zu besitzen. Der wichtigste funktionelle Gegenspieler von BPI ist das 60 kDa große, konstitutiv in Hepatozyten produzierte Serum-Glykoprotein LBP<sup>30</sup>. LBP kann direkt an die äußere Membran gramnegativer Bakterien und an LPS binden. Es katalysiert den Transport von Endotoxin an Membranen und an lösliches CD14. Über die Komplexbildung mit CD14, TLR4 und MD-2 erfolgt die Zellaktivierung. Die ausgelösten proinflammatorischen Reaktionen resultieren in der Mobilisierung zirkulierender Neutrophiler (*polymorphonuclear leucocytes*, PMNs) ins Gewebe, um die Proliferation der Bakterien zu stoppen<sup>7</sup>. Intrazelluläres BPI ist in den Granula dieser PMNs gespeichert und kann mobilisiert werden, um in die phagozytische Vakuole einzuwandern und eine intrazelluläre Bakterienzerstörung zu bewirken. Ein geringer Teil des gespeicherten BPI gelangt in den extrazellulären Bereich. LBP und BPI sind verwandte LPS-bindende Proteine mit einer Identität von 45% in ihrer Aminosäuresequenz<sup>31</sup>. Am stärksten konserviert sind die Regionen, die an der LPS-Bindung beteiligt sind. Die Bindung von BPI oder LBP an LPS löst jedoch entgegengesetzte Reaktion aus. Während LBP LPS-Aggregate zerstört, um dieses an CD14 zu transportieren und eine Zellaktivierung zu ermöglichen, inseriert sich BPI in LPS-Aggregate, fördert die Bindung weiterer LPS-Moleküle und unterbindet somit die Funktion von LBP<sup>32,33</sup>. Im Gegensatz zu BPI führt LBP zu TLR-induzierten Immunantwort, welche ohne fehlende Kontrollmechanismen bis hin zum septischen Schock führen kann. Die koordinierte Wirkung von BPI und LBP ermöglicht eine effiziente Antwort auf und letztendlich die Eliminierung von gramnegativen Bakterien, sowie die Rückkehr zur Homöostase.

### 1.3.2 Die Rolle von BPI bei bakteriellen Infektionen der Atemwege

Mukoviszidose oder Zystische Fibrose (CF, *cystic fibrosis*) ist eine autosomal-rezessive Erbkrankheit, die durch Mutationen im Chlorid-Ionenkanalprotein (CFTR, *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) bedingt ist und zur Absonderung von sehr zähen Schleim (Mucus) in den Bronchien der Patienten führt<sup>34</sup>. Die Wahrscheinlichkeit, an Mukoviszidose zu erkranken, liegt in der hellhäutigen Bevölkerung bei etwa 1:2000. Damit ist CF eine der häufigsten autosomal-rezessiven Erbkrankheiten in dieser Bevölkerungsgruppe. Die mit Flimmerhärchen ausgekleidete Wand der Bronchien ist normalerweise mit einer dünnflüssigen Schleimschicht überzogen, auf der eingeatmete Partikel haften bleiben und abtransportiert werden können. Den zähen Schleim bei Mukoviszidose können die Flimmerhärchen schlecht oder gar nicht abtransportieren, wodurch sich die Luftwege verengen und das Atmen erschweren. Zudem entwickeln sich häufiger Atemwegsinfektionen, da auch Bakterien nicht entfernt werden können und in den Atemwegen verbleiben. Zurzeit gibt es kaum Therapien, die die Ursache bekämpfen, meist werden nur die Symptome behandelt. Hierbei kommt BPI eine besondere Bedeutung zu.

## 1. Einleitung

Die Lungen von Mukoviszidose-Patienten sind meist chronisch mit Bakterien der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) und *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) sowie Hefepilzen kolonisiert<sup>37</sup>. Die Infektion mit *P. aeruginosa*, welche zur chronischen Entzündung und Zerstörung des Lungengewebes führt, ist die häufigste Todesursache in diesen Patienten<sup>38</sup>. Charakteristisch für das Infektionsgeschehen ist eine massive Einwanderung von neutrophilen Granulozyten<sup>42</sup>. Dies begünstigt eine erhöhte Ausschüttung an BPI am Entzündungsherd. Jedoch treten bei CF-Patienten häufig neutralisierende Autoantikörpern gegen BPI (BPI-ANCA, *BPI-antineutrophil cytoplasmic autoantibodies*) auf<sup>39,40</sup>. Die Anwesenheit von BPI-ANCA korreliert sowohl mit der Kolonisation durch *P. aeruginosa* und der Zerstörung des Lungengewebes, als auch mit der Schwere des klinischen Verlaufs<sup>41</sup>. Dies verdeutlicht die wichtige Rolle von BPI bei Erkrankungen der Atemwege. Folglich ist die Funktion von BPI auch bei Atemwegsinfektionen mit grampositiven Erregern, wie *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), auch Pneumokokken genannt<sup>43,44</sup>, von besonderem medizinischem Interesse. Als typische Erreger von Lungeninfektionen führen sie weltweit insbesondere bei Kindern, älteren oder immunsupprimierten Menschen zu schwerwiegenden Krankheitsverläufen, welche tödlich enden können.

### 1.3.3 Die Rolle von BPI bei Erkrankungen des Verdauungstraktes

Der Morbus Crohn (MC) ist eine chronische Entzündung des Magen-Darm-Traktes, wobei meistens der untere Dünndarm und der Übergang zum Dickdarm betroffen sind, wobei alle Schichten der Darmwand betroffen sind. Die Entzündung tritt typischerweise segmental auf, neben erkrankten Abschnitten finden sich gesunde Bereiche. Als Folge des Entzündungsprozesses kann es zu Einengungen des Darmes, sogenannten Stenosen und zu Fisteln, neu entstandenen Entzündungsgängen kommen. Es kann sich um Verbindungen zwischen verschiedenen Darmabschnitten, aber auch um solche zwischen dem Darm und der Haut oder anderen inneren Organen handeln<sup>45</sup>. Die Colitis ulcerosa (CU) ist eine Entzündung, bei der ausschließlich die Schleimhaut des Dickdarmes betroffen ist. Die Entzündung beginnt immer im Enddarm und breitet sich unterschiedlich weit nach distal aus. Sowohl die Entstehung als auch die Auslöser sind bei MC und CU nicht im Detail bekannt<sup>46</sup>. Nach aktuellem Kenntnisstand scheinen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) komplexe Defekte der Homöostase vorzuliegen, die sich aus einer gestörten Interaktion zwischen dem mukosalen Immunsystem, genetischer Prädisposition und Umweltfaktoren, wie z. B. der normalen intestinalen Mikrobiota, zusammensetzen<sup>47</sup>. Hauptsymptome des MC sind dünnflüssiger Stuhl und Bauchschmerzen über einen längeren Zeitraum. Auch Blähungen, Fieberschübe, Übelkeit, Erbrechen und Krämpfe können auf die Krankheit hinweisen. Hauptsymptome bei der CU sind Durchfälle mit Schleim- und Blutbeimengungen und krampfartigen Bauchschmerzen.

## 1. Einleitung

Durchfälle und verminderte Nahrungsaufnahme führen zu Gewichtsverlust und Abgeschlagenheit. Bei Kindern und Jugendlichen können weitere Symptome wie Wachstumsstörungen auftreten. Zusätzlich gibt es Krankheitserscheinungen außerhalb des Darmes, wie Gelenkschmerzen, Entzündungen von Haut und Augen sowie eine spezielle vernarbende Entzündung an den Gallenwegen. Beide Krankheiten sind derzeit noch nicht heilbar<sup>49</sup>. Therapiemaßnahmen zielen darauf ab die Lebensqualität zu verbessern, Beschwerden zu mildern und Entzündungsprozesse zu stoppen<sup>48</sup>. Neben Empfehlungen zum Umgang mit der Erkrankung im Alltag und in Bezug auf die Ernährung, steht die Behandlung mit entzündungshemmenden Medikamenten im Vordergrund. Im Tiermodell gibt es klare Hinweise dafür, dass die bakterielle Besiedlung des Verdauungstraktes eine notwendige Voraussetzung für die Entstehung einer intestinalen Entzündung ist<sup>50-52</sup>. In unterschiedlichen Tiermodellen für CED wurde demonstriert, dass Tiere in keimfreier Umgebung keine Entzündung entwickeln. Dagegen scheint eine physiologische Interaktion mit Bestandteilen der intestinalen Flora aber auch protektive Effekte auf das intestinale Immunsystem zu haben<sup>53,54</sup>. Auch humane Daten liefern zunehmend Hinweise auf die pathogenetisch bedeutende Rolle von darmresidenten Bakterien und bakteriellen Bestandteilen. So konnte gezeigt werden, dass Patienten mit CED eine fehlende immunologische Toleranz gegenüber eigenen Darmbakterien aufweisen, wogegen diese Toleranz bei Gesunden gegeben ist. Zudem wurde eine gesteigerte BPI-Expression<sup>57</sup> in IBD (*inflammatory bowel disease*)-Patienten nachgewiesen<sup>55,56</sup>. Das Risiko, Dickdarmkrebs zu entwickeln, ist bei der Colitis ulcerosa und bei einem Befall des Dickdarms bei Morbus Crohn erhöht, wobei sowohl das Ausmaß der Entzündung sowie die Krankheitsdauer eine entscheidende Rolle spielen.

### 1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Humanes BPI ist seit mehr als drei Jahrzehnten für seine Endotoxin-neutralisierende<sup>58,59</sup> und antibakterielle Wirkung gegen gramnegative Bakterien bekannt. BPI gilt als zentrale Komponente des angeborenen Immunsystems, da es Bakterien direkt bekämpft und Immunantworten moduliert. Relativ neu entdeckt ist das homologe Protein in Mäusen<sup>27-29</sup>, dessen Expression und Funktion daher noch nicht detailliert beschrieben worden sind. Es wurden in der Arbeitsgruppe neue Mausmodelle generiert, um ein besseres Verständnis für die Regulation und Funktion von BPI und seinem Antagonisten, dem LPS-bindenden Protein (LBP)<sup>30-32,60</sup>, sowohl unter homöostatischen, als auch inflammatorischen Bedingungen zu erlangen. Zu Beginn der Arbeit sollten für BPI und LBP humanisierte Mäuse systematisch auf die Expression der beiden Proteine, sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene charakterisiert werden. Hierbei sollten sowohl die Basallevel als auch die Expressionsregulation im zeitlichen Verlauf nach Infektion ermittelt werden. Des Weiteren sollte die Freisetzung von BPI aus *in vitro* stimulierten Granulozyten der transgenen Mäuse

bestimmt werden. Um diese Untersuchungen zu vertiefen war es das Ziel, immortalisierte Stammzelllinien, durch Transduktion mit Hoxb8 exprimierenden Retroviren, zu generieren. Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit sollten Lungeninfektionen BPI-defizienter und für BPI oder BPI und LBP humanisierter Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren sein. Die Bakterienlast, der klinische Verlauf und die antibakterielle Immunantwort auf gramnegative und grampositive Erreger sollten hierbei untersucht werden. Neben dem Modell einer akuten Lungeninfektion, bei der der Infektionsverlauf bis zu 48 Stunden untersucht werden sollte, sollten Überlebensstudien über einen Zeitraum von bis zu 10 Tagen Aufschluss, über die Auswirkungen von BPI auf den Krankheitsverlauf und die Genesung geben. Abschließend sollte ein Vergleich der Darmmikrobiota der verschiedenen Mauslinien vorgenommen werden. Hierbei sollte nicht nur die Rolle von BPI bei der Zusammensetzung des Darmmikrobioms, sondern auch dessen Wirkung bei Entzündungsgeschehen in Modellen der Dextransulfat-induzierten Kolitis untersucht werden.

Aktuelle Publikationen weisen auf genetisch bedingte, signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen C57BL/6 Mausinzuchtlinien, wie z. B. C57BL/6J und C57BL/6N, hin, welche Einfluss auf eine Vielzahl von physiologischen, biochemischen und immunologischen Parametern haben<sup>61-66</sup>. Genetisch modifizierte Mäuse (transgene und Gen-defiziente Mäuse) mit zum Teil unklaren gemischten genetischen Hintergründen dieser Mauslinien werden weltweit zur Klärung verschiedener biologischer und medizinischer Fragen eingesetzt. Daher war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die Auswirkungen genetischer Unterschiede zwischen C57BL6/N und C57BL6/J auf experimentelle Pneumonien und die DSS-induzierte Colitis zu untersuchen.

## 2. Material und Methoden

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Antikörper

Alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper und zu deren Detektion benutzten Sekundärantikörper, sowie Konjugate sind in Tabelle 1 aufgeführt.

**Tabelle 1: Verwendete Antikörper und Konjugate**

Abkürzungen: Anw., Anwendung; Ham., Hamster; IF, Immunfluoreszenz; Katalognr., Katalognummer; Lx, Luminex; Reak., Reaktivität; Verd., Verdünnung; Zk, Zellkultur.

Zielantigen / Konjugat	Reakt.	Wirt	Verd.	Hersteller	Katalognr.	Anw.
B220-PerCP	Maus	Rat IgG2b, κ	1:100	BD	561047	FACS
CD11b-Biotin	Maus	Rat IgG2b, κ	1:200	BD	564985	FACS
CD11c-FITC	Maus	Ham. IgG1, λ2	1:100	BD	553801	FACS
CD16/CD32	Maus	Rat IgG2b, κ	1:500	BD	553142	FACS
CD19-FITC	Maus	Rat IgG2a, κ	1:100	BD	553785	FACS
CD3-Biotin	Mensch	Mouse IgG2a, κ	1:100	BD	555338	FACS
CD3e	Maus	Hamster IgG	1:400	BD	553057	Zk
CD3-PE	Maus	Hamster IgG	1:50	Caltag	A14714	FACS
CD43-PE	Mensch	Mouse IgG1, κ	1:100	BD	560199	FACS
CD45-APC	Maus	Rat IgG2b, κ	1:200	BD	559864	FACS
CD62L-PE	Mensch	Mouse IgG1	1:100	Caltag	MA1-19716	FACS
CD66abc-PE	Mensch	Mouse IgG2a, κ	1:10	BD	551480	FACS
CD8-Biotin	Maus	Rat IgG2a	1:100	eBioscience	ABIN135121	FACS
c-kit-PE	Maus	Rat IgG2a	1:100	Caltag	MA5-17842	FACS
eFluor 450 Streptavidin			1:5000	eBioscience	48-4317-82	
F4/80-APC	Maus	Rat IgG2a	1:100	eBioscience	ABIN282808	FACS
GR-1-PE-Cy7	Maus	Rat IgG2b, κ	1:100	BD	552985	FACS
Ly6G-FITC	Maus	Rat IgG2b, κ	1:100	BD	553126	FACS
m AB a-ms LBP	Maus	Mouse IgG1	1:5000	Biometec	022-2c.1	Lx
m AB a-ms LBP	Maus	Mouse IgG1	1:5000	Biometec	022-1c.2	Lx
mAB-a-hu BPI	Mensch	Mouse IgG1		HyCult	HM2042	Lx
mAB-a-hu BPI	Mensch	Mouse IgG1		HyCult	HM2041B	Lx
mAB-a-hu BPI - Biotin	Mensch	Mouse IgG1	1:7000	HyCult	HM2042BT	ICS, IF
mAB-a-hu LBP	Mensch	Mouse IgG1		Biometec	023-4c.2	Lx
mAB-a-hu LBP	Mensch	Mouse IgG1		Biometec	023-3c.2	Lx
mAB-a-hu LBP -Biotin	Mensch	Mouse IgG1	1:15000	Biometec	023-3c.2	Lx
mAB-a-ms LBP	Maus	Mouse Ascites		Biometec	022-3b	Lx
mAB-a-ms LBP	Maus	Mouse IgG1		Biometec	022-2c.1	Lx
MR/CD206-PE	Maus	Rat IgG2a	1:100	Serotec	MCA2235PE	FACS
pAB-a-hu BPI	Mensch	Rabbit IgG		HyCult	HP9022	Lx

## 2. Material und Methoden

PE-Streptavidin			1:5000	BD	554061	FACS, IF
r hu LBP	Mensch			Biometec		Lx
r ms LBP	Maus			Biometec	013-1.2	Lx
Sca-1-APC	Maus	Rat IgG2a	1:100	eBioscience	ABIN282850	FACS

### 2.1.2 Arbeitsgeräte

Alle in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 2 aufgelistet.

**Tabelle 2: Arbeitsgeräte**

Geräte	Hersteller
Airflow-Control EN 14175	Bense Laborbau, Deutschland
Analysewaage	Sartorius, Göttingen
Benchtop Incubated Orbital Shaker Model 420	Thermo Scientific, USA
Biofuge Pico	Heraeus, England
Brutschrank	Heraeus, England
Brutschrank, CO <sub>2</sub> Inkubator	Heracell 150i
Chemilux Pro	Intas, Göttingen
Cryotherm	Biosafe, Switzerland
DynaMag™-2 Magnetic Particle Concentrator (MPC)	life technologies, Darmstadt
FACS Canto II	BD, USA
Floor Incubated&Refrigerated Orbital Shaker Model 435, 480	Thermo Scientific, USA
Fluoreszenz Mikroskop BZ-9000	Keyence, Deutschland GmbH
Geldokumentationsanlage	BioRad, München
Gelkammer	Amersham, England
Gelkammer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Hochgeschwindigkeits-Kühlzentrifuge RC5BPlus, RC5CPlus	Thermo Scientific, USA
Hochgeschwindigkeits-Kühlzentrifuge Rotixa/RP	Hettich, Tuttlingen
Horizontalschüttler Titramax 1000	Heidolph, Schwabach
Icecube, Computer controlled Rate Freezer	Sylab, Österreich
Kühlzentrifuge, Typ 5417	Eppendorf, Wesseling.Berzdorf
Laminar Flow Einheit	BDK, Genkingen
LightCycler-Instrument	Roche Diagnostics, Mannheim
Magnetrührer mit Heizung MR 3001K	Heidolph, Schwabach
Magnetrührer TYP MR3001	Heidolph, Schwabach
Magnetständer, Magnetic Particle Concentrator, MPC	life technologies, Darmstadt
Microcomputer Electrophoresis Power supply E425	Boskamp
Microplate Reader	BioRad, München
Mikrozentrifuge	Labnet International Inc.
Mikrozentrifuge	Uni Equip, Deutschland
Mikrozentrifuge Eppendorf 5417R	Eppendorf, Wesseling
Mikrozentrifuge Eppendorf 5417R/5430	Eppendorf, Wesseling.Berzdorf
Milli-Q Academic A10	Millipore, USA
Milli-Q Academic A10	Millipore, USA
Mini-PROTEAN Tetra System	BioRad, München
MS1 Minishaker	Roth, Deutschland

## 2. Material und Methoden

Multifuge 3 S-R	Heraeus, England
Multifuge 3 S-R	Heraeus, England
Partikelzähler	Casy TTC, Schärfe System
pH-Meter pH 522	WTW, Weilheim
pH-Meter pH 522	WTW, Weilheim
Pipetboy	Integra, Bioscience
Pipetboy acu	Integra Bioscience, Hudson ,NH
Pipetman, Mikroliterpipetten	Gilson, Frankreich
Präzisionswaage	Sartorius, Göttingen
QikSpin	Edwards, Australia
Rotator	Stuart Scientific, USA
Rührgerät IKA Turrax	IKA, Staufen
Scepter™	Millipore, USA
Schüttelwasserbad Julabo SW 20C	Julabo, Seelbach
Sequence Detection System ABI-Prism 7900 HT	Life technologies, Darmstadt
Sequencer GS FLX+	Roche LifeScience, Mannheim
Shandon Cytospin Centrifuge	Thermo Scientific, USA
Spannungsgerät LKB ECPS 3000/150	Pharmacia, Schweden
Spectrophotometer ND-1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Spectrophotometer SmartSpec™Plus	BioRad, München
Spektralphotometer NanoDrop ND2000	Thermo Scientific, USA
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Frankfurt
Thermocycler	BioRad, München
Thermocycler Veriti 96 Well Thermal Cycler	life technologies, Darmstadt
Thermomixer comfort	Eppendorf, Wesseling.Berzdorf
Tissue Lyser	Qiagen, Hilden
Vakuumpumpe	Sartorius, Göttingen
Vakuumpumpe	KNF, Freiburg
Vario-Cooler	Bosch, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
Vortex Mixer Minishaker	IKA, Staufen
Waage R200D	Sartorius , Göttingen
Waage Typ LC621S	Sartorius, Göttingen
will wilover S	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Zentrifuge Allegra X-12	Beckman Coulter, Krefeld

### 2.1.3 Bakterienstämme, Plasmide und Zelllinien

In den folgenden Tabellen sind alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide aufgelistet. Des Weiteren wurden Phoenix-Zellen, basierend auf 293T-Zellen, einer menschlichen, embryonalen Nierenzelllinie verwendet, um durch Transfektion aus Plasmiden mit retroviralen Elementen nicht replikationsfähige Retroviren für die vorgesehenen Gentransfers erzeugen zu können. Das für die Generierung von ER-Hoxb8-immortalisierten-Knochenmarksstammzellen benötigte Zytokin SCF (*stem cell factor*), wurde aus Kulturüberständen von entsprechend transfizierten CHO-Zellen (*chinese*



## 2. Material und Methoden

hamster ovary cells) gewonnen. Die verwendeten CHO-Zellen wurden vom Institut für Immunologie, der Universität Regensburg zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme**

Abkürzungen: ATCC, *American Type Culture Collection*; IMS, Interner Mikrobiomstandard k.I., Infekt., Infektionsmodelle; klinisches Isolat; LB, *Lysogeny-Broth*; TSB, *Tryptic-Soy-Broth*; FCS, *fetal calf serum*)

Stamm	Herkunft	Medium/Kultur	Verw.
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i>	DSMZ	<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i> Medium, 36±2 °C	IMS
<i>Escherichia coli</i> DH5α	Invitrogen	LB, 37 °C	Klonierung
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853	ATCC	TSB, 37 °C	Infekt.
<i>Rhizobium radiobacter</i>	DSMZ	LB (flüssig), Müller-Hinton (fest), RT	IMS
<i>Salinibacter ruber</i>	DSMZ	<i>Salinibacter ruber</i> Medium, 36±2 °C	IMS
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	k.I.	TSB/10 % FCS, 37 °C + 5 %CO <sub>2</sub>	Infekt.
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 49619	ATCC	TSB, 37 °C + 5 %CO <sub>2</sub>	Infekt.

**Tabelle 4: Verwendete Plasmide**

Name	Verwendung	Herkunft
3HA-ERHBH-HoxB8-neo	Generierung von ER-Hoxb8-Zellen	Freiburg
pGEM_Alicyclobacillus_16S	Interner Mikrobiomstandard	Eigenes Labor
pGEM_Rhizobium_16S	Interner Mikrobiomstandard	Eigenes Labor
pGEM_Salinibacter_16S	Interner Mikrobiomstandard	Eigenes Labor
pGEM-T	Klonierung	Promega
pGEM-Teasy	Klonierung	Promega
pGEM-Teasy_Akkermansia	Interner Mikrobiomstandard	Eigenes Labor

### 2.1.4 Chemikalien

Alle Chemikalien, die für die Durchführung dieser Arbeit benötigt wurden sind, sofern nicht im Text vermerkt, in Tabelle 5 aufgelistet.

**Tabelle 5: Chemikalien**

Chemikalien	Bezugsquelle
Agar	Nährbodenküche (NBK)
Agarose	Sigma, München
Ampicillin	Sigma, München
Bacterial Lysis Buffer	Roche, Mannheim
Bovines Serum Albumin	Roth, Karlsruhe
CaCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, München
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Dextransulfat (Molekulargewicht: 36-50 kDa)	MP Biomedicals, Heidelberg
DMSO	Sigma-Aldrich, München
Dulbecco`s phosphate Buffered Saline	Sigma, München
EMSURE 2-Propanol 100 %	Merck, Darmstadt

## 2. Material und Methoden

EMSURE Ethanol 100 %	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fibronectin	Sigma, München
Formaldehyd	Serva GmbH, Heidelberg
Glycerin 87 %	AppliChem, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hematoxylin Solution Mayer's, pH 2,4 AT	Sigma Aldrich, USA
Hefeextrakt	NBK
Heparin	Ratiopharm, Neu-Ulm
Incidin 0,5 %	NBK
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
KAPA Library Quant Dilution Buffer (5 mM Tris-HCl pH 8.0 mit 0,05 % Tween 20) Hergestellt aus: Trizma hydrochloride buffer solution 1 M Tween 20	Sigma-Aldrich, USA Fisher Scientific,
KCl	Merck, Darmstadt
LB-Medium	NBK
LiChroSolv Reinstwasser	Merck, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Mueller-Hinton-Agar	NBK
NaBr	Sigma-Aldrich, USA
NaCl	Merck, Darmstadt
NaHCO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
NaOH 10 M	Sigma, München
Natriumazid	Roth, Karlsruhe
PBS ohne	NBK
PenStrep	JenaBioscience, Jena
Polybren	Sigma-Aldrich, München
Potato Dextrose Broth	Fluka, USA
Saponin	Sigma, München
Tissue-Tek® OCT™ Compound	Sakura, VAE
Tissue-Tek® OCT™ Cryomold	Sakura, VAE
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
Tris-EDTA (TE) 10 x Solution	Fisher Scientific, Schwerte
Trypanblau	Biochrom AG, Berlin
Universal Agarose	Bio & Sell, Nürnberg
Zitronensäure	Merck, Darmstadt
Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe

## 2. Material und Methoden

### 2.1.5 Enzyme

Die zur Anfertigung dieser Arbeit benötigten Enzyme sind in Tabelle 6 aufgeführt.

**Tabelle 6: In dieser Arbeit eingesetzte Enzyme.**

Enzym	Hersteller
iScript™ Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR	Bio Rad, München
Platinum ® Taq DNA Polymerase	Life Technologies, Darmstadt
Proteinase K, recombinant, PCR grade	Roche Diagnostics, Mannheim
Trypsin-EDTA	PAN Biotech GmbH, Aidenbach

### 2.1.6 Kommerziell erhältliche Systeme

**Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Kits für die Molekularbiologie.**

Kit	Hersteller
10 mM dNTP Mix, PCR Grade	Life Technologies, USA
Agencourt AMPure XP 5 ml Kit	Beckmann-Coulter, Krefeld
BCA Protein Assay Reagent	Thermo Scientific Pierce, USA
Diff-Quick	Medion Diagnostics, Gräfelfing
FLX Titanium PicoTiterPlate Kit 70 x 75	Roche, Mannheim
GS FLX Titanium emPCR Breaking Kits LV/MV, 12 pc	Roche, Mannheim
GS FLX Titanium LV emPCR Kit (Lib-L) v2 oder GS FLX Titanium LV emPCR Kit (Lib-A) v2	Roche, Mannheim
GS FLX Titanium Sequencing Kit XL+ enthält: - GS FLX Titanium Sequencing Kit Reagents XL+ (Sequencing Reagents XL+, Sequencing Enzymes XL+, Titanium Bead and Wash Buffers) - Titanium Buffer CB XL+, Titanium Pre-Wash tubes XL+, Titanium Sipper Tubes XL+ - Titanium Packing Beads 70, Titanium Supplement CB XL+	Roche, Mannheim
iScript Advanced cDNA Sythesis Kit	BioRad, München
KAPA Library Quantification Kit For Roche 454 GS Titanium platform Enthält: KAPA SYBR® FAST LightCycler 480 qPCR Kit 1 x 1 ml 454 Titanium Primer Premix (10X) 6 x 80 µl 454 Titanium DNA Standards	KAPA Biosystems, Vertrieb über peqLab, Erlangen
LightCycler® 480 Probes Master	Roche, Mannheim
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	Roche, Mannheim
lightning-Link™ Biotin Conjugation Kit (Type A)	Innova Biosciences
MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Large Volume Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
pGEM-T Vector System	Promega, USA
pGEM-Teasy Vector System	Promega, USA

## 2. Material und Methoden

Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Life Technologies, Darmstadt
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Niederlande
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Niederlande
QIAshredder	Qiagen, Niederlande
RNA Blood Mini kit	Qiagen, Niederlande
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Niederlande
SYBR® Select Master Mix	Applied Biosystems, USA
<i>SlowFade Gold antifade</i> Reagenz	Invitrogen, USA

**Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete ELISA- Kits.**

Kit	Hersteller
muIL-10	muIL-10
muIL-12p40/p70	muIL-12p40/p70
muIL-17	muIL-17
muIL-6	muIL-6
muIL-8	muIL-8
muKC	muKC
muMIP-1 $\alpha$	muMIP-1 $\alpha$
muMIP-2	muMIP-2
muTNF $\alpha$	muTNF $\alpha$

### 2.1.7 Molekulargewichtsstandard

Für die Agarosegelelektrophorese wurde der *Gene Ruler 100 bp DNA ladder* und *Gene Ruler 1 kb DNA ladder* von Thermo Scientific als Molekulargewichtsstandard verwendet.

### 2.1.8 Nährmedien

Nährmedien für die Kultivierung von Zelllinien und Primärzellen wurden vom Hersteller bezogen und bei 4 °C gelagert. Nährmedien für Bakterien wurden von der Nährbodenküche des Instituts für Medizinische Mikrobiologie bereitgestellt.

**Tabelle 9: Nährmedien und Zusatzstoffe.**

Abkürzungen: FCS, *fetal calf serum*; h. i., hitzeinaktiviert; P/S, Penicillin/Streptomycin.

Nährmedium	Zusätze	Bezugsquelle
RPMI-Medium 1640	-	Gibco, USA
RPMI-Medium 1640	10 % FCS h. i., 1 % P/S, 1 % Glutamin, 50 $\mu$ M $\beta$ - Mercaptoethanol	Gibco, USA
Optimem	10 % FCS h. i., 1 % P/S, 1% Glutamin, 50 $\mu$ M $\beta$ - Mercaptoethanol	Gibco, USA

## 2. Material und Methoden

DMEM	10 % FCS h. i., 1 %P/S, 1 %Glutamin	Gibco, USA
<i>Alicyclobacillus acidiphilus</i> Medium	12 g Potato Dextrose Broth; 5 ml sterile Zitronensäure; Millipore Wasser ad 500 ml	Nährbodenkücke (NBK), Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
<i>Salinibacter ruber</i> Medium	NaCl 97,5 g; MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O 17,3 g; MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 24,8 g; CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 0,63 g; KCl 2,5 g; NaHCO <sub>3</sub> 0,13 g; NaBr 0,31 g; Millipore Wasser ad 500 ml	Nährbodenkücke (NBK), Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

### 2.1.9 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide für qRT-PCR Anwendungen wurden von *Thermo-Scientific* bezogen und sind in Tabelle aufgeführt. Die *Primer* wurden in einer Stammkonzentration von 100 pmol/μl bei -20 °C gelagert und in einer Endkonzentration von 0,2 μM in Polymerasekettenreaktionen (*polymerase chain reactions*, PCRs) eingesetzt. *Primer* für NGS-Anwendungen wurden von den Firmen Integrated DNA Technologies IDT oder Biomers.net GmbH bezogen. *TaqMan* Sonden wurden von der Firma IB Molbiol bezogen.

**Tabelle 10: Verwendete Oligonukleotide und Sonden.**

Abkürzungen: Anw, Anwendung; NGS, *Next Generation Sequencing*; qRT-PCR, quantitative Echtzeit-PCR (*quantitative Real-Time-PCR*); TA, Anlagerungstemperatur; \*, *touch down* PCR (-1 °C pro Zyklus).

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	T <sub>A</sub>	Anwendung
Aacidi-193F	GAGGAAAGTTGCAAATGCAACA	68 °C	NGS
Aacidi-238TM	6FAM-AGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCCCA-BBQ	68 °C	NGS
Aacidi-453R	AGGAGCTTTCCTCTCCTTAT	68 °C	NGS
AM_1313s_TM	6FAM-CTGCAACCCGCCTACACGAAGCC-BBQ	68 °C	NGS
AM1_1128F	CAGCACGTGAAGGTGGGGAC	68 °C	NGS
AM2_1436R	CCTTGCGGTTGGCTTCAGAT	68 °C	NGS
GS Junior-16S-P5_MID1	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGAGTGCGTCCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS
GS Junior-16S-P5_MID14	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGAGAGATACCCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS
GS Junior-16S-P5_MID14	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGAGAGATACCCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS
GS Junior-16S-P5_MID15	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATACGACGTACCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS
GS Junior-16S-P5_MID15	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATACGACGTACCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS

## 2. Material und Methoden

GS Junior-16S-P5_MID16	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCACGTACTACCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS
GS Junior-16S-P5_MID16	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCACGTACTACCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS
GS Junior-16S-P5_MID17	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGTCTAGTACCCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS
GS Junior-16S-P5_MID17	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGTCTAGTACCCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS
GS Junior-16S-P5_MID18	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTACGTAGCCCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS
GS Junior-16S-P5_MID19	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGTACTACTCCCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS
GS Junior-16S-P5_MID2	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGCTCGACACCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS
GS Junior-16S-P5_MID20	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGACTACAGCCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS
GS Junior-16S-P5_MID21	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGTAGACTAGCCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS
GS Junior-16S-P5_MID22	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACGAGTATGCCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS
GS Junior-16S-P5_MID23	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACTCTCGTGCCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS
GS Junior-16S-P5_MID24	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAGAGACGAGCCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS
GS Junior-16S-P5_MID25	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCGTCGCTCGCCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS
GS Junior-16S-P5_MID26	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACATACGCGTCCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS
GS Junior-16S-P5_MID27	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGCGAGTATCCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS
GS Junior-16S-P5_MID28	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACTACTATGTCCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS
GS Junior-16S-P5_MID29	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACTGTACAGTCCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS
GS Junior-16S-P5_MID3	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGACGCATCCCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS
GS Junior-16S-P5_MID30	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGACTATACTCCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS
GS Junior-16S-P5_MID31	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGCGTCGTCTCCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS
GS Junior-16S-P5_MID32	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGTACGCTATCCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS
GS Junior-16S-P5_MID33	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATAGAGTACTCCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS
GS Junior-16S-P5_MID34	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGACGCTACGTCCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS
GS Junior-16S-P5_MID35	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAGTAGACGTCCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS

## 2. Material und Methoden

GS Junior-16S-P5_MID36	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCGACGTGACTCCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS
GS Junior-16S-P5_MID37	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACACACTCCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS
GS Junior-16S-P5_MID38	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACACGTGATCCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS
GS Junior-16S-P5_MID39	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACAGATCGTCCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS
GS Junior-16S-P5_MID4	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAGCACTGTAGCCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS
GS Junior-16S-P5_MID40	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACGCTGTCTCCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS
GS Junior-16S-P5_MID41	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAGTGTAGATCCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS
GS Junior-16S-P5_MID42	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCGATCACGTCCTACGGGNG GCWGCAG	64 °C	NGS
HPRT-P1	GTTGAATACAGGCCAGACTTTGTG	63 °C	NGS
HPRT-P2	GATTCAACTTGGCTCATCTAGGC	63 °C	NGS
N10_muLBP-P1	GTCGTGGGCAGTACGAGTTTC	68 °C*	qRT-PCR
N10_muLBP-P2	CTCGGACACCGATGGAAGA	68 °C*	qRT-PCR
N11_muLBP-P1	GCAGCCGCATTTGTGATTG	68 °C*	qRT-PCR
N11_muLBP-P2	TTCGACTCGATCTGGTTGTGG	68 °C*	qRT-PCR
N12_muBPI-P1	GGATGATGTGACCTCGGTTG	68 °C*	qRT-PCR
N12_muBPI-P2	GTGTTCAGCTGGAATCTGCC	68 °C*	qRT-PCR
N14_muGATA-1-P1	GGCCCCCTTGTGAGGCCAGAGAG	68 °C*	qRT-PCR
N14_muGATA-1-P2	CGCTCCAGCCAGATTCGACCC	68 °C*	qRT-PCR
N15_muGATA-1-P1	TCGTCATACCACTAAGGTGGC	68 °C*	qRT-PCR
N15_muGATA-1-P2	AGGGCAGAATCCACAACTG	68 °C*	qRT-PCR
N16_muGATA-2-P1	ACACACCACCCGATACCCACCTAT	68 °C*	qRT-PCR
N16_muGATA-2-P2	CTAGCCCATGGCAGTCACCATGCT	68 °C*	qRT-PCR
N17_muGATA-2-P1	CACTACCTGTGCAATGCCTG	68 °C*	qRT-PCR
N17_muGATA-2-P2	GCCATAAGGTGGTGGTTGTC	68 °C*	qRT-PCR
N18_muC/EBPa-P1	GTCAGTGGTCAACTCCAGCA	68 °C*	qRT-PCR
N18_muC/EBPa-P1	AGTCGGTGGACAAGAACAGC	68 °C*	qRT-PCR
N6_huBPI-P1	TCCTGACTACTCAGACAGCTTT	68 °C*	qRT-PCR
N6_huBPI-P2	ATATTGGCGTTGCTGATGGAG	68 °C*	qRT-PCR
N7_huBPI-P1	AACGCCAATATCAAGATCAGCG	68 °C*	qRT-PCR
N7_huBPI-P2	CCGAAATGGACATGCCTTCTAT	68 °C*	qRT-PCR
N8_huLBP-P1	ACTGGAGAGCAGGATTTGCG	68 °C*	qRT-PCR
N8_huLBP-P2	AATGTCGGCGAACTGTCAAT	68 °C*	qRT-PCR

## 2. Material und Methoden

Rradio-126-F2	GGAACATACCCTTTCCTGCGG	68 °C	NGS
Rradio-166TM	LC670-AATTAATACCGCATACGCCCTACG--BBQ	68 °C	NGS
Rradio-197-R2	GGAACATACCCTTTCCTGCGG	68 °C	NGS
Salini-180TM2	LC640-CACGTCGTCTGGATCCCGCATG-BBQ	68 °C	NGS
Salini-413R	TACGCCCCATAGGGGTGT	68 °C	NGS
Salini-7F	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	68 °C	NGS

### 2.1.10 Puffer und Lösungen

Die Zusammensetzung aller in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen ist der Tabelle 11 zu entnehmen, oder an entsprechender Stelle im Text vermerkt.

**Tabelle 11: Puffer und Lösungen**

Name	Zusammensetzung
Cytofix/Cytoperm	4 % Paraformaldehyd; 1 % Saponin
Erythrozyten-Lysepuffer	150 mM NH <sub>4</sub> Cl; 1 mM KHCO <sub>3</sub> ; 0,1 mM Na <sub>2</sub> EDTA; pH 7,2-7,4
FACS-Puffer	PBS <sub>ohne</sub> ; 1 % FCS; 1 mg/ml NaN <sub>3</sub>
Fixierungslösung	4 % Formaldehyd in PBS
Ladepuffer 5 X	Glycerol; 0,5 M EDTA; Bromphenolblau; Xylenecyanol
Perm/Wash	PBS; 0,1 % Saponin
Permeabilisierung	0,5 % Saponin, 1 % BSA in PBS
Procarta Zellysepuffer	Affymetrix
RNAlater Solution	Applied Biosystems
Stopplösung	125 mM Glycin in PBS
TAE 50 X	2 M Tris; 50 mM EDTA; 1 M Eisessig; pH 8,2

### 2.1.11 Stimulantien

Alle Substanzen, die zur Stimulation in Zellkulturversuchen eingesetzt wurden, sind in Tab. 12 aufgelistet. *E. coli* LPS wurde zudem in Tierversuchen angewandt.

**Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete Stimulantien.**

Stimulanz	Stock	Bezugsquelle
Cytochalasin B	10 µg/µl (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich, München
<i>E. coli</i> LPS (Serotyp 0111:B4)	1 mg/ml	Sigma-Aldrich, München
Estradiol	10 mM	Sigma-Aldrich, München
<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i> (G-CSF)	2 µg/ml	PeproTech GmbH, Hamburg
muIL3	100µg/ml (1:50 in RPMI)	PeproTech GmbH, Hamburg
muIL6	100µg/ml (1:50 in RPMI)	Immuno Tools, Friesoythe
N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP)	4 µg/µl (9,14 mM)	Sigma-Aldrich, München



## 2. Material und Methoden

### 2.1.12 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 13: Verbrauchsmaterialien**

Verbrauchsmittel	Bezugsquelle
15 ml High-Clarity Polypropylene Conical Tube	BD Falcon, Heidelberg
15 ml Spitzboden-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
50 ml High-Clarity Polypropylene Conical Tube	BD Falcon, Heidelberg
aerosoldichte Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
BD MICROLANCE Kanüle 22 G 1 1/4 0,7x30 mm	Becton Dickinson GmbH, Plattling
BD MICROLANCE Kanüle 23 G 1 1/4 0,6x30 mm	Becton Dickinson GmbH, Plattling
BD MICROLANCE Kanüle 27 G 3/4 0,4x19 mm	Becton Dickinson GmbH, Plattling
Cap Strips domed, PCR clean	Eppendorf, Hamburg
DNA LoBind Tubes 1,5 ml PCR clean, safe lock	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Tubes 5,0 ml, PCR clean	Eppendorf, Hamburg
Feather Disposable Scalpel 11	FEATHER Safety Razor Co., Ltd., Japan
Feather Disposable Scalpel 22	FEATHER Safety Razor Co., Ltd., Japan
Glass Beads (Ø 2.5 mm)	Roth, Karlsruhe
INJEKT Spritzen m.zentr.Konus Luer 2 ml	Braun
LightCycler 480 Sealing Foil	Roche, Mannheim
MagNA Pure 96 Filter Tips (1,000 µl)	Roche Diagnostics, Mannheim
MagNA Pure 96 Instrument	Roche Diagnostics, Mannheim
MagNA Pure 96 Output Plate	Roche Diagnostics, Mannheim
MagNA Pure 96 Processing Cartridge	Roche Diagnostics, Mannheim
MagNA Pure 96 Sealing Foil	Roche Diagnostics, Mannheim
Messbecher (25-2000ml)	Schott Duran, Mainz
Messpipetten, Kunststoff (2, 5, 10, 25ml)	Hirschmann, Eberstadt
Messzylinder (10-2000ml)	Schott Duran, Mainz
Mikroküvetten Ultravette, Kunststoff	Brand, Wertheim
Mikroliterspritze (50ml)	Hamilton, Schweiz
PCR-Reaktionsgefäße	Applied Biosystems, Weiterstadt
PCR-Tubes (0,5 ml)	Biozym, Oldendorf
PCR-Tubes, 0,5 ml gemischte Farben	Biozym, Oldendorf
Pipetten, Glas (2, 5, 10, 20ml)	Hirschmann, Eberstadt
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (aerosoldicht)	Biozym, Oldendorf
Pipettenspitzen, Kunststoff	Greiner, Nürtingen
Polypropylen Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Polypropylenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner, Nürtingen
Polypropylenrundbodenröhrchen (14 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Precellys Glass kit tube (Ø 0.1 mm)	Peqlab, Erlangen
Rotilabo®-Einbettkassetten	Carl Roth, Karlsruhe
SafeGuard™FilterTips peqGold	peqLab, Erlangen
Schikanekolben (25-3000 ml)	Schott Duran, Mainz
Schottflaschen (100-2000 ml)	Schott Duran, Mainz
Spritzen BD Plastipak	Becton Dickinson, Heidelberg
sterile 1,5 ml und 2 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter Filtropur S 0,2	Sarstedt, Nümbrecht

## 2. Material und Methoden

Sterilpipetten Cellstar (2, 5, 10, 25 ml)	Greiner, Nürtingen
Thermo-Strip 0,2 ml	ThermoScientific, USA
<i>twin.tecPCR-Plate, unskirted</i>	Eppendorf, Hamburg
variable Pipetten mit 2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson, Frankreich
Zellkulturflaschen, Kunststoff (50 ml, 250 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkulturplatte 96-well, Flachboden	Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifugenbecher (50 ml, 500 ml)	Herolab, Wiesloch
Scepter™ Sensors, 60µm	Millipore, USA
Halb-Mikroküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
LightCycler 480 Multiwell Plates	Roche, Mannheim
Glaspipetten cell star	Greiner, bio-one, Frickenhausen
Tubes (15 ml, 50 ml)	Greiner, bio-one, Frickenhausen
Polystyrene Round bottom Tubes	BD Falcon™, USA
Pipettenspitzen ( <i>safeGuard Filter Tips</i> )	peQlab Biotechnology GmbH, Erlangen
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Greiner, bio-one, Frickenhausen
Zellkulturflaschen	BD Falcon™, USA
Multiwell-Zellkulturplatten (6 wells)	BD Falcon™, USA
Cryotube vials	Thermo Scientific, USA
Zellkulturschalen (15 cm)	Greiner, bio-one, Frickenhausen

### 2.1.13 Versuchstiere

Die Tiere wurden gemäß europäischer Richtlinie 2010/63 EU gehalten. Eine Genehmigung für den Betrieb der Tierhaltung gem. §11 TSchG liegt vor. Die Haltungsbedingungen (Klimatisierung und Ausstattung der Räume, Haltungssystem, tierpflegerische und medizinische Versorgung) sind für die hier beschriebenen Versuche geeignet und wurden von der zuständigen Behörde (Aufsichtsbehörde) regelmäßig dahingehend überprüft. Die Tiere bedurften keiner besonderen Vorbereitung, da sie aus D4 Barriere A (= Kernzucht) stammten. Für den gesamten Zucht-/Haltungsbereich der Versuchstiere wurde der SPF-Hygienestatus regelmäßig nachgewiesen. Das Hygienekonzept für die Tierlaboratorien der Universität Regensburg genügt den wissenschaftlichen und tierschutzrechtlichen Anforderungen für die durchgeführten Versuche. Der SPF-Hygienestatus wird dreimal jährlich durch Kontrollen gemäß FELASA-Richtlinien bestätigt und in einem "*Health Monitoring Report*" (HMR) dokumentiert. Das Hygienekonzept des D4-Tierlabors liegt den zuständigen Behörden (Genehmigungs- und Aufsichtsbehörden) vor; der aktuelle HMR kann von der Aufsichtsbehörde jederzeit eingesehen werden.

**Tabelle 14: Verwendete Mausstämme.**

Mausstamm	Hintergrund	Herkunft	Referenz
BPI KO	C57BL/6J	Eigenzucht Uni Regensburg	-
BPI-BAC+	C57BL/6J	Eigenzucht Uni Regensburg	-
BPI-LBP-BAC+	C57BL/6J	Eigenzucht Uni Regensburg	-
C57BL/6J	C57BL/6J	Eigenzucht Uni Regensburg	-
C57BL/6N	C57BL/6N	Eigenzucht Uni Regensburg	-

## 2. Material und Methoden

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Anzucht von Bakterien

*E. coli* Bakterien wurden immer unter Schütteln bei 37 °C in *Lysogeny-Broth*-Medium (LB-Medium; 10 g/l Bacto Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7.5) kultiviert. LB-Platten für die Bakterien-Ausplattierung wurden aus der hauseigenen Nährbodenküche bezogen. Die Anzucht von Pseudomonaden erfolgte bei 37 °C in *Tryptic-Soy-Broth*-Medium (TSB-Medium; Caseinpepton 17 g/l, Sojamehlpepton 3 g/l, NaCl 5 g/l, Glucose 2,5 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5 g/l) ohne Schütteln. Ausplattiert wurden diese stets auf Blutplatten und bei 37 °C bebrütet. Für die Anzucht von Streptokokken wurde diesem Medium zusätzlich 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes FCS (Sigma) beigelegt. Streptokokken wurden auf Sojaplaten mit 5 % Schafblut ausgestrichen und bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Generell wurden die Bakterien für Infektionen zuerst mit einem Drei-Ösen-Ausstrich aus den bei -70 °C gelagerten Glycerolstocks vereinzelt und ÜN kultiviert. Mit einer Einzelkolonie wurde möglichst spät am nächsten Abend ein frischer Ausstrich angefertigt und wiederum ÜN inkubiert. Die Einstellung der Bakterienzahl erfolgte durch die Bestimmung der oD<sub>600</sub> in einem Photometer (Pecolab, Erlangen). Eine oD<sub>600</sub> von 0,1 entsprach dabei einer Konzentration von ca.  $1 \times 10^8$  Bakterien pro ml. Die Bakterien wurden mit sterilem PBS (Sigma) von der Platte abgespült und auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Zur Kontrolle der eingestellten Bakterienzahl wurde eine Verdünnungsreihe des Inokulums auf Blutagarplatten ausplattiert. Bei der Anzucht der Bakterienstämme für die Internen Mikrobiomstandards wurden für jede Bakterienart Festnährmedien mit einer bei -70 °C gelagerten Stammkultur beimpft und unter folgenden Bedingungen inkubiert. Die Bebrütung von *Alicyclobacillus acidiphilus* erfolgte bei 36±2 °C für 48-72 Stunden, aerob, in *Alicyclobacillus* Medium. *Alicyclobacillus* bildet runde, leicht schleimige, cremig-weiße Kolonien. Die Bebrütung von *Rhizobium radiobacter* erfolgte bei Raumtemperatur für 48-72 Stunden, aerob, in LB-Medium (flüssig) oder Müller-Hinton Festnährmedien. Die Wachstumsform zeichnete sich durch runde, opak-weiße Kolonien aus. Die Bebrütung von *Salinibacter ruber* erfolgte bei 36±2 °C für 48-72 Stunden, aerob, in *Salinibacter* Flüssig-Medium. *Salinibacter* wuchs in runden, konvexen Kolonien mit roter Pigmentierung. Jeweils 5 ml der sterilen Flüssignährmedien wurden steril in ein 15 ml Spitzbodenröhrchen überführt. Für jede Bakterienart wurden jeweils drei Röhrchen einer Einzelkolonie der bewachsenen Festnährmedien inokuliert.

#### 2.2.2 Auftrennung von DNA-Gemischen mittels Agarose-Gelelektrophorese

Zur Trennung verschieden großer DNA-Fragmente in Gemischen sowie zur qualitativen und quantitativen Analyse von DNA-Lösungen wurden diese gelelektrophoretisch in 1 bis 3 %-

## 2. Material und Methoden

igen Agarose Gelen in einem TAE-Puffersystem aufgetrennt. Die DNA-Proben wurden hierfür mit 6 x DNA-Ladepuffer versetzt. Als Referenz wurde eine Mischung von DNA-Fragmenten definierter Größe mitgeführt. Der Gellauf erfolgte bei einer Spannung von max. 10 V/cm Gellänge. Anschließend erfolgte eine 20-minütige Inkubation des Gels in wässriger Ethidiumbromid-Lösung (0,5 g/ml). Die analytische oder präparative Auswertung und Dokumentation erfolgte auf einer Geldokumentationsanlage (BioRad, München).

### 2.2.3 Bestimmung der Bakterienlast aus BAL-Flüssigkeit und Gewebehomogenat

Alle Schritte zur Bestimmung der Bakterienlast wurden auf Eis und mit auf 4 °C gekühltem sterilem PBS durchgeführt. Es wurde sowohl mit der BAL-Flüssigkeit (BALF) als auch den Gewebehomogenaten eine Verdünnungsreihe in 1:10er-Schritten in PBS hergestellt. Jeweils 100 µl der Verdünnungsstufen, unverdünnt bis 1:10<sup>7</sup>, wurden auf Blutagar-Platten ausplattiert. Nach einer ÜN-Kultur bei 37 °C (für Pseudomonaden 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>) wurden am nächsten Morgen die gewachsenen Kolonien (*colony forming units*, CFU) gezählt und aus dem Mittelwert mehrerer Verdünnungsstufen die Gesamt-Bakterienlast berechnet.

### 2.2.4 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)

Die Durchführung der bronchoalveolären Lavage (BAL) erfolgte an zuvor abgetöteten Tieren. Zunächst wurde die Trachea freipräpariert und für ca. 5 mm mit einem Venenverweil-Katheter (Braun) intubiert. Die Kanüle wurde mit einem Bindfaden fest in der Trachea fixiert, um die Lunge mit einer 1 ml *Soft-Ject* Spritze zweimal mit je 0,7 ml sterilem PBS spülen zu können. Die mit PBS gefüllte Lunge wurde vorsichtig massiert, um eine gleichmäßige Spülung der Lunge zu erzielen. Die so gewonnene BAL-Flüssigkeit (BALF) wurde für verschiedene Untersuchungen verwendet und daher stets auf Eis gelagert. Zur Bestimmung der Zellzahl eingewanderter Leukozyten, wurden 100 µl BALF abgenommen und mittels einer Neubauer-Zählkammer, unter der Verwendung von Trypanblau, ausgezählt. Weitere 100 µl wurden mittels Zytocentrifugation auf Objektträger aufgebracht und einer DiffQuik-Färbung unterzogen, um eine quantitative Aussage über die Art der eingewanderten Zellen treffen zu können. 200 µl der BALF wurden abgenommen, um die Bakterienlast zu bestimmen. Die restliche BALF wurde bei 4 °C und 300 x g für 10 min abzentrifugiert. Das so erhaltene Zellpellet wurde für weitere Untersuchungen bei -70 °C eingelagert. Die zellfreie BALF wurde bis zur Messung von Zytokinen mittels Luminex oder ELISA bei -20 °C gelagert.

## 2. Material und Methoden

### 2.2.5 Calcium-Phosphat-Transfektion

30 min vor der Calcium-Phosphat-Transfektion wurden die Phoenix-Zellen in frisches Medium überführt. Der Transfektionsansatz bestand jeweils aus 10 µg DNA und 62 µl CaCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, München) in 500 µl H<sub>2</sub>O. Neben der gewünschten DNA wurde jeweils ein Ansatz mit einer GFP (*green fluorescent protein*)-DNA und ein Ansatz ohne DNA mitgeführt, um sowohl die Transfektionseffizienz, als auch das Überleben der Zellen dokumentieren zu können. Da die Phoenix-Zelllinie bereits über die Erbinformation zur Verpackung der Viren verfügt, wäre in diesem Falle keine zusätzliche, für Hüllproteine kodierende DNA nötig. Diese wurde jedoch zur Steigerung der Verpackungseffizienz und damit der Virusausbeute ebenfalls mit transfiziert. Der DNA-Ansatz wurde unter Vortexen zu 500 µl 2 x HBS (*Hanks' Balanced Salt solution*, Sigma-Aldrich, München) langsam zugetropft. Nach 90-sekündiger Inkubation bei RT, wurde der Ansatz zu den Phoenix Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit mit 5 % CO<sub>2</sub>. Um tote Zellen zu entfernen, wurde am nächsten Morgen das Medium gewechselt. Die Ernte des Virusüberstandes erfolgte am darauf folgenden Tag. Hierfür wurde der Überstand abgenommen, bei 300 x g, für 5 min, bei RT zentrifugiert und anschließend durch einen 0,22 µm Filter steriltfiltriert und zur Steigerung der Transduktionseffizienz mit 4 µg/ml Polybren (Sigma-Aldrich, München) versetzt.

### 2.2.6 Differenzierung von ER-Hoxb8-Stammzellen zu Neutrophilen

Zur Induktion der Stammzelldifferenzierung wurden die immortalisierten Knochenmarksstammzellen für 8 min, bei RT und 300 x g zentrifugiert. Um jegliche Bestandteile des Kulturmediums zu entfernen, wurden die Zellen 2 x mit PBS, 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes FCS, und SCF (1:50) gewaschen. Die gewünschte Zellzahl wurde anschließend im entsprechenden Differenzierungsmedium aufgenommen. Die Differenzierung durch Estradiol-Entzug erfolgte mit einer Zellzahl von 3 x 10<sup>5</sup> Zellen pro well einer 6-well-Platte in 3 ml Optimem, 10 % (v/v) FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % Glutamin und SCF (1:25). Die Differenzierung wurde in diesem Protokoll alleinig durch das Fehlen von Estradiol im Medium eingeleitet. Bei der Differenzierung durch Estradiol-Entzug und G-CSF Stimulierung, wurde eine Zellzahl von 1,5 x 10<sup>5</sup> Zellen pro well einer 6-well-Platte in 3 ml Optimem 10 % (v/v) FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % Glutamin und 2 ng/ml G-CSF (*granulocyte-colony-stimulating factor*, Sigma-Aldrich, München) eingesetzt. Hier sollte die Differenzierung zu neutrophilen Granulozyten zusätzlich durch die Stimulation mit G-CSF gefördert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.2.7 DiffQuik-Färbung

Der Färbeansatz bestand aus 3 gebrauchsfertigen, kommerziell erhältlichen Lösungen, deren erzieltetes Färbeergebnis der Pappenheim-Färbung entspricht. Die Vorteile dieser Färbemethode liegen in der gleichbleibenden, reproduzierbaren Färbequalität, bei kurzer Färbezeit, von nur etwa einer Minute. Die gut differenzierbare Färbung eignet sich sowohl für Hämatologie, Zytologie und Histologie gleichermaßen. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen wurden Zellen in 200 µl PBS mittels Zytozentrifugation (Shandon Cytospin Centrifuge, Thermo Scientific, USA) bei 400 rpm für 5 min auf Objektträger aufgebracht. Nach kurzer Trocknung wurden die Zellen mittels DiffQuik (Medion Diagnostics, Gräfelfing) gefärbt. Hierfür wurden die Objektträger nacheinander je fünfmal für je eine Sekunde zunächst in eine Fixierlösung (0,002 g/l Fast Green in Methanol), dann in die erste Färbelösung (1,22 g/l Eosin Y in Phosphatpuffer, pH 6,6 + Natriumazid), sowie in eine zweite Färbelösung (1,1 g/l Thiazin-Farbstoff in Phosphatpuffer, pH 6,6) eingetaucht. Abschließend wurden die Objektträger unter fließendem VE-Wasser vorsichtig von der Rückseite gespült und ÜN getrocknet. Die Präparate wurden unter Verwendung von Objektiven mit 10-, 20- und 40-facher Vergrößerung am Mikroskop (Keyence, Deutschland) dokumentiert.

### 2.2.8 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Lichtstreuungs- und Fluoreszenzeigenschaften. Dabei werden monoklonale Antikörper zunächst an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt. In diesem Fall lagen die Farbstoffe FITC (*Fluorescein-Isothiocyanat*), PerCP (*Peridinin-Chlorophyll Protein*), PE (*Phycoerythrin*), APC (*Allophycocyanin*) und Pacificblue an die jeweiligen Antikörper gekoppelt vor. Nach Markierung von Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern durch Bindung an spezifische Oberflächenmoleküle können diese im Durchflusszytometer charakterisiert werden. Für alle Analysen wurden die entsprechenden Zellen zunächst bei 300 x g, für 8 min, bei RT geerntet und zweimal mit FACS-Puffer (PBS<sub>ohne</sub>, 1 % FCS, 1 mg/ml NaN<sub>3</sub>) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen zu je 100 µl aliquotiert und, um unspezifische Bindungen zu vermeiden, mit CD16/32 (Fc-Block) für 5 min, bei RT inkubiert. Die Oberflächenfärbung erfolgte mit 10 µl der spezifischen Antikörperversdünnungen für 15 min, bei RT, im Dunklen. Nach der 15-minütigen Inkubation mit den Sekundärantikörpern wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde den Zellen, die einen biotinylierten Antikörper im Gemisch erhielten, eFluor450 zugegeben und erneut 10 min, bei RT im Dunklen inkubiert. Für intrazelluläre Färbungen wurden die Zellen durch *Cytofix/Cytoperm* (4 % Paraformaldehyd, 1 % Saponin) fixiert und permeabilisiert. Nach 20 min Inkubation bei RT wurden die Proben mit *Perm/Wash* (PBS, 0,1 % Saponin) gewaschen, für 20 min mit dem jeweiligen

## 2. Material und Methoden

Antikörper inkubiert und erneut zweimal mit *Perm/Wash* gewaschen. Zuletzt wurde mit dem entsprechenden Detektionsantikörper für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert, bevor die Zellen erneut zweimalig mit *Perm/ Wash* gewaschen und in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen wurden. Die fertigen Proben wurden mit dem Gerät FACS Canto II (BD) vermessen.

### 2.2.9 Einfrieren und Auftauen von ER-Hoxb8-Zellen

Es wurden stets  $1 \times 10^6$  Zellen in 1 ml *Cryotube vials* (Thermo Scientific, USA) eingefroren. Hierfür wurden die Zellen abgenommen, mittels Millipore *Scepter* ausgezählt und bei 300 x g, für 8 min, bei RT abzentrifugiert. Das Pellet wurde in der entsprechenden Menge Optimum mit Zusätzen aufgenommen und auf Eis gestellt. Nun wurde im gleichen Verhältnis eiskaltes FCS, 20 % DMSO (Sigma-Aldrich, München), SCF-Überstand (1:25) und 2 µM Estradiol langsam zugetropft. Die Zellen wurden am *Icecube, Computer controlled Rate Freezer* (Sylab, Österreich) mit einem vorgespeicherten Programm zum Einfrieren von PBMCs eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Für das Auftauen der Stammzellen wurden 12 ml Optimum, 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % Glutamax mit 480 µl SCF und 2 µM Estradiol auf 37 °C vorgewärmt. Die Zellen wurden für 90 sec in einem 37 °C warmen Wasserbad geschwenkt und in ein 15 ml Reaktionsgefäß (BD Falcon) überführt. 9 ml des vorgewärmten Mediums wurden langsam zugetropft. Die Zellsuspension wurde für 5 min, bei RT und 300 x g abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 3 ml des vorgewärmten Mediums aufgenommen und in einen Napf einer mit Fibronectin beschichteten 6-well-Platte gegeben. Am nächsten Tag wurde 1 ml frisches Medium (Zusammensetzung wie oben beschrieben) zugegeben. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen abgenommen, bei RT für 8 min und 300 x g abzentrifugiert, in 6 ml Medium resuspendiert und auf 2 Näpfe aufgeteilt. Nach dreitägiger Inkubation bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> wurde die Kultivierung, wie unter Punkt beschrieben fortgeführt.

### 2.2.10 Enzyme-linked Immunosorbant Assay (ELISA)

Die Messung von Zytokinen und Chemokinen in Zellkulturüberständen, im Serum und der bronchoalveolären Lavage Flüssigkeit (BALF) infizierter Mäuse erfolgte mittels Sandwich-ELISA. Hierzu wurden komplette ELISA-Kits von BD Biosciences (muIL-6, muIL-10 und muTNF $\alpha$ ), BD Pharmingen (muIL-12p40/p70, muIL-17) sowie von R&D Systems (muIL-8, muKC, muMIP-1 $\alpha$ , muMIP-2) gemäß Herstellerangaben verwendet. Die Mikrotiterplatten wurden dabei generell mit den jeweiligen spezifischen Primärantikörpern in Beschichtungspuffer ÜN bei 4 °C beschichtet. Zwischen allen weiteren Schritten, wurden die Platten vier Mal mit Waschpuffer (PBS, 0,05 % (v/v) Tween20) gewaschen. Die

## 2. Material und Methoden

Blockierung der Platten erfolgte mit PBS/10 % (v/v) FCS für 60 min bei RT. Nach den bereits beschriebenen Wasch- und Blockierungsschritten wurden die Proben in Blockpuffer verdünnt (Serum mind. 1:10) oder unverdünnt aufgetragen und ÜN bei 4 °C inkubiert. Die Detektion erfolgte anschließend mit biotinylierten Zweitantikörpern und der Zugabe von Streptavidin-HRP. Alle Inkubationsschritte wurden dabei in 50 µl pro *well* durchgeführt, die Waschschrte erfolgten mit 200 µl pro *well*. Die Konzentration der Proben wurde anhand einer 9-stufigen Verdünnungsreihe rekombinanten Proteins bestimmt.

### 2.2.11 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur Rückgewinnung gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Hersteller-Protokoll eluiert. Aufgereinigte DNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 2.2.12 Fibronectinbeschichtung von Zellkulturplatten

Für die Herstellung von ER-Hoxb8-immortalisierten Knochenmarksstammzelllinien, wurden 6-*well*-Platten (BD Falcon) mit Fibronectin (Sigma, München) beschichtet. Hierfür wurde Fibronectin 1:100 in sterilem PBS (Sigma) verdünnt. Jeweils 500 µl der Verdünnung wurden in einen Napf der Platte pipettiert und durch Schwenken der Platte verteilt. Die Beschichtung erfolgte entweder für 2 Stunden bei 37 °C, oder ÜN bei 4 °C. Vor Verwendung wurde die Fibronectinlösung abgesaugt. Nicht benutzte *wells* wurden mit 1 ml PBS vor Austrocknung geschützt.

### 2.2.13 Generierung und Kultivierungsbedingungen von ER-Hoxb8-Stammzellen

Die retroviral transduzierten Knochenmarkszellen wurden für einen Zeitraum von 21 Tagen weiter bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. In diesem Zeitraum wurden die Zellen dreimal wöchentlich zu 1 x 10<sup>5</sup> Zellen pro *well*, einer mit Fibronectin beschichteten 6-*well*-Platte (BD Falcon, USA), in 3 ml Optimem, 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % Glutamax, SCF-Überstand (1:25) und 2 µM Estradiol aufgeteilt. Hierfür wurden jeweils ein komplettes *well* geerntet und bei 300 x g, für 8 min, bei RT abzentrifugiert. Die Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen, mit einem Scepter (Millipore, USA) und 60 µm Sensoren (Millipore, USA) gezählt und in neue *wells* pipettiert. Nach 21-tägiger Passage sollten nur noch immortalisierte Knochenmarksstammzellen vorhanden sein. Ab diesem Zeitpunkt wurden verschiedene Chargen eingefroren und die Dauerkultur, wie oben beschrieben weiter kultiviert.



## 2. Material und Methoden

### 2.2.14 Gewebeaufschluss für Luminex-Proteinbestimmungen

Für die Protein-Analyse mittels Luminex, wurden die Gewebe in 2 ml *Tubes* (Eppendorf) eingewogen und pro 100 mg Gewebe mit 500 µl Procarta Zellysepuffer (Affymetrix) versetzt. Die Gewebe wurden mechanisch in einem *Tissue-Lyser* (Qiagen) für 5 min bei 30 Hz aufgeschlossen. Die Bestimmung des Proteingehalts in den Proben erfolgte in Duplikaten in 96-well Flachbodenplatten (Nunc) anhand einer BSA-Standardreihe. Hierfür wurden die Proben 1:10 und 1:100 in MilliQ-Wasser verdünnt, 20 µl dieser Verdünnungen in die 96-well Platte vorgelegt und 200 µl des BCA (=Bicinchoninsäure)-Reagenz (*BCA Protein Assay Reagent*, Thermo Scientific) zugegeben. Die Platten wurden für 30 min bei 37 °C inkubiert und im *Microplate-Reader* (BioRad, München) vermessen.

### 2.2.15 Gewinnung von Blut- und Serumproben

Die Entnahme von Herzblut erfolgte am unmittelbar zuvor abgetöteten Tier mit 2 ml INJEKT Spritzen (Braun) und BD Microlance Kanülen (Becton Dickinson). Für Vollblutanalysen wurde das Blut mit Heparin versetzt und umgehend in den entsprechenden Assay eingesetzt. Für RNA-Analysen wurden die Proben mit EDTA versetzt und ebenfalls direkt aufgearbeitet. Zur Serumgewinnung wurde das Blut zunächst 1 h bei RT inkubiert und direkt, oder nach ÜN-Kultur bei 4 °C, für 10 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert. Der klare Serum-Überstand wurde in frische Reaktionsgefäße (Eppendorf) überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

### 2.2.16 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

*E. coli* DH5α Bakterien (Invitrogen; Genotyp: F-  $\phi$ 80/*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (*r<sub>k</sub>*<sup>-</sup>, *m<sub>k</sub>*<sup>+</sup>) *phoA supE44* λ- *thi-1 gyrA96 relA1*) wurden in einem Volumen von 200 ml LB-Medium bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer *oD*<sub>600</sub> von 0,4 kultiviert und dann 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt mit 500 x g für 10 min bei 4 °C wurde das Pellet in 25 ml TFB I Puffer (30 mM KAc, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 15 % (v/v) Glycerin, pH 5.8) resuspendiert und 2 h auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 5,5 ml TFB II Puffer (10 mM MOPS, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl, pH 6.5) aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Aliquots in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf) auf Eis pipettiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C eingelagert.

## 2. Material und Methoden

### 2.2.17 Histopathologische Begutachtung von Kolonpräparaten

Der histologische Kolitis-Gesamtscore wurde im rektalen Bereich des Intestinaltrakts ermittelt und ergab sich aus der Summe der Scores von Epithelschaden und entzündlichem Infiltrat.

**Tabelle 15: Kolitis-Gesamtscore**

Histologische Veränderung	Beobachtung	Score
Epithelschaden (defekte Kryptenarchitektur, Becherzellverlust)	kein	0
	fokaler Becherzellverlust	1
	großflächiger Becherzellverlust	2
	begrenzter Kryptenverlust	3
	großflächiger Kryptenverlust	4
Entzündliches Infiltrat (Masse, Ausdehnung)	kein	0
	spärlich an der Kryptenbasis	1
	(PMN-)Infiltrate auch zwischen den Krypten	2
	konfluierend, bis in die Submukosa	3
	transmurale Ausdehnung	4
max. Gesamtscore		8

### 2.2.18 Immunfluoreszenzmikroskopie

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen bei 300 x g für 8 min bei RT abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml PBS aufgenommen und 200 µl der Zellsuspension durch Zytocentrifugation auf ein Deckgläschen aufgebracht. Danach wurden die Zellen mittels Fixierungslösung für 15 min fixiert und die Fixierung im Anschluss durch eine 5-10 minütige Inkubation mit der Stopplösung abgestoppt. Zuletzt wurde das Deckgläschen dreimal mit 500 µl PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellen wurde die Lösung für 30 min auf die Deckgläschen gegeben und mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden 200 µl Fc-Block (CD16/CD32) für 5 min auf die Proben gegeben, die Block-Lösung abgesaugt und die Proben mit 200 µl mAB-a-huBPI-Biotin markiert. Nach einer 20-minütigen Inkubation wurde dreimal mit PBS gewaschen und 200 µl des sekundären Antikörpers Streptavidin-PE für 15 min auf die Proben gegeben. Es erfolgten erneut drei Waschschritte mit PBS und die Gläschen wurden im Dunkeln getrocknet. Zuletzt wurden die Proben mit *SlowFade Gold antifade* Reagenz eingedeckelt und nach vollständiger Trocknung am Fluoreszenzmikroskop (Keyance) analysiert.

### 2.2.19 Induktion einer akuten oder chronischen Kolitis

Dextransulfat ist ein Natriumsalz, das durch Veresterung von Dextran mit Chlorschwefelsäure erzeugt wird. Der Schwefelgehalt dieser Substanz variiert zwischen 15 % und 20 %, entsprechend 1.9 Sulfatgruppen pro Glykosylrest. DSS liegt als geruchloses, weißes bis weißgelbliches, wasserlösliches Pulver mit leicht salzigem Geschmack vor. Zur Durchführung der Versuche wurde DSS mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 40.000 Dalton (MP Biomedicals, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Zur Herstellung einer DSS-Lösung von 1 % wurden 10 g DSS in 1 l unbehandeltem Leitungswasser gelöst. Entsprechend wurde bei der Herstellung der Lösung in der Konzentrationen 1,5 % verfahren, wobei 15 g in 1 l Leitungswasser gelöst wurde. Die DSS-Lösung wurde für jeden Zyklus neu angesetzt. Zur Induktion einer akuten Colitis erfolgte die Verabreichung von DSS über einen Zeitraum von 7 Tagen. Die Tiere wurden an Tag 8 abgetötet und die Gewebe entnommen. Zur Beobachtung der Regenerationsfähigkeit verschiedener Mausstämme erfolgte im Anschluss an die DSS-Gabe eine Erholungsphase von 6 Tagen, in denen die Tiere wieder Wasser bekamen. Die Probenentnahme erfolgte an Tag 13. In beiden Modellen wurde das Gewicht der Tiere täglich erfasst. Zur Induktion der chronischen Kolitis erhielten die Mäuse vier Mal je 7 Tage DSS-haltiges Trinkwasser. Die Behandlungszeiträume waren durch 7-tägige Intervalle mit reinem Trinkwasser unterbrochen, an die letzte DSS-Behandlung schloss sich ein 28-tägiger Zeitraum mit reinem Trinkwasser an. Das Versuchsende war am Tag 77 nach der erstmaligen DSS-Administration. Das Gewicht der Tiere wurde bei Versuchsende erfasst.

### 2.2.20 Intratracheale Infektionen

Um Lungeninfektionen mit verschiedenen Bakterien in den Versuchstieren zu induzieren, wurden diese intratracheal infiziert. Hierfür wurden die Tiere in einer Narkosekammer (Dräger Vapor-Einstellung 3,5 % (v/v)) mit Isofluran (Baxter) narkotisiert und dann mit den oberen Schneidezähnen an einem Bindfaden, der quer über eine Styroporbox gespannt war, rücklings aufgehängt. Durch Druck auf den Bindfaden wurden die oberen Atemwege verschlossen, während mit einer gebogenen Pinzette die Zunge festgehalten wurde, um das Schlucken zu verhindern. So wurde das auf die gewünschte Bakterienzahl eingestellte Inokulum in 100 µl sterilem PBS in den Rachenraum pipettiert. Nach Einsetzen des Atemreflexes wurde die Suspension in die Lunge eingeatmet.

### 2.2.21 Isolation und Kultivierung von Knochenmarksstammzellen

Zur Isolierung von Knochenmarkszellen wurden Femur und Tibia der entsprechenden Mäuse präpariert und mit 10 ml RPMI (Gibco), versetzt mit 15 % (v/v) hitzeinaktiviertem FCS (Gibco) gespült. Die erhaltenen Zellsuspensionen wurden durch 100 µm Zellsiebe von

## 2. Material und Methoden

gröberen Bestandteilen befreit und bei 300 x g, für 8 min, bei RT abzentrifugiert. Die im Pellet enthaltenen Zellen wurden anschließend zweimal mit RPMI gewaschen. Zur Erythrozytenlyse wurde 5 ml eines Lysepuffers (150 mM NH<sub>4</sub>Cl; 0,1 mM Na<sub>2</sub>EDTA; 10 mM KHCO<sub>3</sub>; pH 7,2-7,4) zugegeben und umgehend bei 300 x g, für 5 min, bei RT zentrifugiert. Die so gewonnen Knochenmarkszellen wurden in 10 ml RPMI, 15 % (v/v) hitzeinaktiviertes FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % Glutamin aufgenommen und in 10 cm Zellkulturschalen (Greiner, bio-one, Frickenhausen) ausgesät. Nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Zellen auf Adhärenz beurteilt. Bei einem hohen Prozentsatz adhärenter Zellen würde der ÜS in frische Schalen überführt. Die Knochenmarkszellen wurden für zwei Tage mit einem Zytokinmix aus 10 ng/ml muIL-3 (PeproTech GmbH, Hamburg), 10 ng/ml muIL-6 (PeproTech GmbH, Hamburg) und SCF-Überstand (1:25) vorstimuliert. Die vorstimulierten Knochenmarkszellen wurden bei 300 x g, für 5 min, bei RT abzentrifugiert und anschließend mit einer Neubauer Zählkammer und Trypanblau ausgezählt. Die Zellen wurden auf eine Zellzahl von 2 x 10<sup>6</sup> Zellen pro 500 µl eingestellt und erneut bei 300 x g, für 5 min, bei RT abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in der entsprechenden Menge Optimem (Gibco) aufgenommen und zu 500 µl in eine mit Fibronectin beschichtete 6-well-Platte aufgeteilt.

### 2.2.22 Kultivierungsbedingungen für CHO-Zellen

Stabil transfizierte CHO (*chinese hamster ovary*)-Zellen zur Herstellung von rekombinantem SCF (*stem cell factor*) wurden vom Institut für Immunologie zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte in Optimem Medium (Gibco, USA) supplementiert mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem FCS (Gibco), 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco), 1 % Glutamin (Gibco) und 30 µM β-Mercaptoethanol (Roth) bei 37 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % mit 5 % CO<sub>2</sub>. Die Zellen wurden stets bei einer Konfluenz von 70-80 % gehalten. Die Ablösung der adhärenten Zellen erfolgte für 5 min bei 37 °C mit Trypsin-EDTA (PAN Biotech GmbH, Aidenbach).

### 2.2.23 Kultivierungsbedingungen für Phoenix-Zellen

Phoenix-Zellen sind die zweite Generation einer Retroviren-produzierenden Zelllinie, zur Herstellung von ekotrophen und amphotrophen Retroviren. Die Zelllinie basiert auf 293T Zellen, einer humanen embryonalen Nierenzelllinie. Der einzigartige Vorteil dieser Linie besteht in der hohen Transfektionsrate, bei der bis zu 50 % oder mehr der Zellen mit herkömmlichen Protokollen, wie der Calcium-Phosphat-Transfektion, transient transfiziert werden können. Durch diese Zelllinie kann innerhalb weniger Tage Virusüberstand produziert werden. Die Kultivierung von Phoenix Zellen erfolgte in DMEM-Medium unter Zugabe von 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin und

## 2. Material und Methoden

1 % Glutamax bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub>. Die Zellen wurden im Rhythmus von 3-4 Tagen, spätestens beim Erreichen einer Konfluenz von 70-80 %, im Verhältnis 1:5 passagiert.

### 2.2.24 Luminex-xMAP®-Technologie

Die Luminex-xMAP®-Technologie ermöglicht eine quantitative Analyse von bis zu 100 verschiedenen Parametern (Zytokine, andere lösliche Moleküle) gleichzeitig. Hierfür werden *Beads* (5,6 µm große Polystyrolkugeln) verwendet, welche spezifisch fluoreszenzgefärbt sind, dadurch genau voneinander unterschieden werden können und eine exakte Analyse der Proben ermöglichen. An diese voneinander unterscheidbaren *Bead*-Populationen können z. B. proteinspezifische *Capture*-Antikörper gekoppelt werden. Die *Beads* binden an die Zielmoleküle in den Proben, welche dann durch die Zugabe eines spezifischen biotinylierten Detektions-AK über PE-markiertes Streptavidin nachgewiesen werden können. Für die Proteinbestimmung von humanem BPI bzw. LBP wurde ein 2-plex-Assay der Firma MicroBIOMix GmbH, Regensburg verwendet. Die Gewebelysate wurden zunächst 1:4 verdünnt, um die störenden Effekte des verwendeten Lysepuffers zu minimieren. Für die Konzentrationsbestimmung von murinem IFN $\gamma$ , IL-10, IL12p40/p70, IL17, IL-6 und TNF- $\alpha$ , aus Zellkulturüberständen, nach Lymphknotenstimulation wurde ein selbst zusammengestellter muriner 6-plex-Assay der Firma Invitrogen, Camarillo CA, oder ein selbst zusammengestellter ProcartaPlex™ Multiplex Immunoassay der Firma Affymetrix-eBioscience benutzt. Die Proben wurden unverdünnt eingesetzt. Für die Konzentrationsbestimmung von murinem IL-10, IL12p40/p70, IL-6, MCP-1, MIP-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$ , aus BAL-Flüssigkeiten wurde ebenfalls ein selbst zusammengestellter 6-plex-Assay der Firma Invitrogen, Camarillo CA für die entsprechenden murinen Faktoren verwendet. KC und MIP-2 wurden zusätzlich mit einem selbst zusammengestellten ProcartaPlex™ Multiplex Immunoassay der Firma Affymetrix-eBioscience vermessen. Für die Konzentrationsbestimmung von humanem BPI und humanem, sowie murinem LBP, zur Untersuchung der Expressionsregulation nach Infektion, wurde ein 3-plex-Assay der Firma MicroBIOMix GmbH, Regensburg verwendet. Die Proben wurden verdünnt (Serumproben: 1:2, 1:200 und 1:2000 bzw. 1:2, 1:100 und 1:2000 - Nachmessungen: 1:10, 1:250, 1:2500; BAFL: 1:2, 1:200 bzw. 1:2 und 1:100 - Nachmessungen 1:20), um einen möglichst großen Messbereich abzudecken. Für die Konzentrationsbestimmung von humanem BPI aus den Stimulationsversuchen wurde ein 1-plex-Assay der Firma MicroBIOMix GmbH, Regensburg verwendet. Die Proben wurden verdünnt (unbehandelte Proben: 1:2; behandelte Blutproben: 1:100 oder 1:50; *Freeze-Thaw*-Proben: 1:100; Hoxb8-Proben: 1:2 und 1:10), um einen möglichst großen Messbereich abzudecken. Alle Durchführungen und Vermessungen erfolgten nach Herstellerangaben. Die Rohdaten wurden im Luminex 100™ ausgelesen. Die Berechnung der 7-gliedrigen Standardkurve

## 2. Material und Methoden

und die Datenauswertung wurden mit der Liquichip Analyzer Software (Qiagen, Deutschland) durchgeführt.

### 2.2.25 LPS-induzierte Regulation von BPI und LBP

Zur Induktion einer Expressionsregulation von BPI und LBP im zeitlichen Verlauf wurde jeder Maus *E. coli* LPS (Serotyp 0111:B4, Sigma Aldrich) in der jeweiligen Konzentration gelöst in 1 ml sterilem, 37 °C warmen PBS intraperitoneal (i.p.) injiziert (Microlance 3-Kanüle; 0,5 x 25 mm; BD). Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Tiere abgetötet und umgehend Herzblut zur Serumgewinnung entnommen. Anschließend erfolgte eine peritoneale Lavage mit 1 ml sterilem PBS. Sowohl die Serum- als auch Lavage-Proben wurden bis zur Proteinmessung im Luminex 100™ bei -20 °C gelagert.

### 2.2.26 Next Generation Sequencing

#### 2.26.1 Herstellung des Internen Mikrobiom-Standards

Zur Prozesskontrolle aller folgenden Einzelschritte wurde ein interner Mikrobiom-Standard der Probenmatrix zugegeben. Dieser bestand aus drei ausgewählten eubakteriellen Spezies (*Salinibacter ruber*, *Alicyclobacillus acidiphilus* und *Rhizobium radiobacter*), die unterschiedlichen eubakteriellen Phyla angehören, sich in ihrer Zellwandstruktur unterscheiden und in verfügbaren humanen und murinen Mikrobiom-Datensätzen nicht vorkommen. Diese Bakterienspezies wurden einzeln auf separat hergestellten Flüssignährmedien angezüchtet und die Zellzahl der Suspension quantitativ durch Spektralphotometrie (SmartSpec™ Plus, Bio-Rad) bestimmt. Die Bakterienspezies wurden anschließend in definierter Menge zu einem Bakterienpool vermischt, der für die nachfolgenden Schritte vor der Nukleinsäureextraktion direkt der Probenmatrix zugegeben und quantitativ über RT-PCR Protokolle verfolgt wurde.

#### 2.26.2 Isolation und Aufreinigung von Stuhl DNA

Für die Präparation von Stuhlsuspensionen wurden 100 mg Stuhl, einer einzelnen Maus (gesamter Inhalt des Blinddarms zuvor in flüssigem Stickstoff eingefroren, bei -70 °C gelagert, auf Eis aufgetaut) und in ein 2 ml Schraubdeckelgefäß (Sarstedt) eingewogen. Nach Zugabe von 250 µl sterilem PBS wurde die Suspension gevortext (Vortex Genie 2, Scientific Industries, USA) und kurz in einer Mikrozentrifuge anzentrifugiert. Zur Homogenisierung des Probenmaterials und zur chemischen sowie enzymatischen Lyse zellulärer oder mikrobieller Bestandteile wurden 180 µl *Bacteria Lysis Buffer* (Roche) und 20 µl Proteinase K (Fermentas) zugegeben. Die Proben wurden gevortext und für 10 min

## 2. Material und Methoden

bei 65 °C und 850 rpm in einem Thermomixer (Eppendorf) inkubiert. Anschließend wurden die Suspensionen 4 x in flüssigem Stickstoff schockgefroren (circa 1 min) und umgehend in kochendem Wasser aufgetaut (circa 1 min), um Mikroorganismen die eine rigide Zellwandstruktur aufweisen, zu lysieren. Es erfolgte die Zugabe von 400 µl *Bacteria Lysis Buffer* und einem *Bead Mix* aus 0,5 g *zirconia/silica beads* (Ø 0,1 mm, BioSpec/Roth) und 4 Glaskugeln (Ø 2,5 mm, BioSpec/Roth). Die *Beads* wurden vorher in 1,5 ml Reaktionsgefäße eingewogen und autoklaviert. Die Proben wurden in einem *Tissue Lyser* (Qiagen) bei RT für 2 min bei 30 Hz behandelt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 95 °C im Thermomixer wurden Stuhlpartikel und *Beads* bei 4 °C für 5 min bei voller Leistung in einer Microzentrifuge (Eppendorf) abzentrifugiert. Der Überstand wurde in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Zu den verbliebenen Stuhlpartikeln und *Beads* wurden 300 µl *Bacteria Lysis Buffer* zugegeben. Diese wurden erneut im *Tissue Lyser* und Thermomixer, wie bereits beschrieben, behandelt und abzentrifugiert. Der gewonnene Überstand, wurde mit dem vorher abgenommenen Überstand vereint und, wenn nötig, mit *Bacteria Lysis Buffer* auf 1000 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und in eine *MagNA Pure 96 Processing Cartridge* (Roche Diagnostics, Mannheim) pipettiert. Alle nachfolgenden Schritte der Nukleinsäureaufreinigung wurden im *MagNA Pure* Gerät (Roche Diagnostics, Mannheim) vollautomatisch durchgeführt. Die DNA-Extraktion basiert auf der „*Magnetic Bead*“-Technologie, wobei das Zelllysat mit speziell beschichteten magnetischen Glaskugeln in einem Puffer mit Guanidinium-Salzen vermischt wird. Aufgrund der chaotropen Salzkonzentration und der hochmolaren Ionenstärke des Lyse- und Bindepuffers kann die freigesetzte DNA an die Silikatoberfläche der sich frei in der Lösung befindlichen magnetischen Glaskugeln binden. Durch einen Magneten wurden anschließend die *Beads* aus der Suspension entfernt (Festphasen-Separation), wobei ungebundene Proteine sowie weitere Komponenten, welche die PCR inhibieren könnten, durch mehrere Waschschrte mit einem speziellen Waschpuffer (*MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Large Volume Kit*) abgetrennt wurden. Am Ende des automatisierten Verfahrens wurden die Nukleinsäuren mit einem vorgewärmten Elutionspuffer (*MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Large Volume Kit*) von den *Beads* in die *MagNA Pure 96 Output Plate* eluiert. Die erhaltene Konzentration wurde anschließend an einem Spektralphotometer (NanoDrop ND2000, Thermo Scientific) vermessen.

### 2.26.3 Realtime-PCR Zur Quantifizierung 16S ribosomaler Genkopien

Mit Hilfe von *Primern* (Biomers.net GmbH), die an konservierte Nukleotidsequenzabschnitte des 16S ribosomalen RNA Gens binden, wurden diese 16S rDNA-Abschnitte im Sequence Detection System ABI-Prism 7900 HT (Life Technologies, Darmstadt) amplifiziert. Bei diesem RT-PCR Verfahren von 16S ribosomalen Genkopien zur Analyse des Mikrobioms eines Habitats wurde ein Amplifikat mit einer variablen Größe (ca.

## 2. Material und Methoden

150 bp) für verschiedene Bakterienspezies der Mikrobiota erzeugt. Der im PCR-Ansatz enthaltene SYBR-Green Farbstoff, des *LightCycler 480 SYBR Green I Master* (Roche) interkaliert in doppelsträngige DNA-Moleküle. Somit wurde mit Fortschreiten der Amplifikation mit jedem Zyklus ein stärkeres Fluoreszenzsignal erhalten. Ein parallel mitgeführter Plasmid-Standard (pGEM\_Teasy\_16S in den Verdünnungsstufen  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ), der inserierte 16S rDNA-Sequenzabschnitte enthielt, diente zur Erstellung einer Standardkurve. Anhand der Amplifikationsschwellenwerte (*Crossing-Points* bzw. *Cycle Threshold*), die von der SDS2.2-Software (Applied Biosystems) ermittelt wurden, konnte eine Standardgerade ermittelt werden. Diese Standardgeradenfunktion ermöglichte dann das Umrechnen der Amplifikationsschwellenwerte der Probenmoleküle in einen Konzentrationswert. Anhand dieser Konzentrationen ließ sich die in der analysierten Probe vorhandenen 16S ribosomalen RNA Genkopien berechnen.

### 2.26.4 RT-PCR Quantifizierung des Internen Mikrobiom Standards

Für die Prozesskontrolle wurde ein interner Standard hergestellt. Dieser bestand aus einer Suspension dreier definierter Bakterienspezies, welcher der Probe vor der Nukleinsäureextraktion zugegeben wurde. Mit Hilfe von *Primern* (Biomers.net GmbH), die an speziesspezifische Nukleotidsequenzabschnitte des 16S ribosomalen RNA Gens binden, wurden diese 16S rDNA-Abschnitte im LightCycler 480 II amplifiziert. Die RT-PCR gestützte Erfassung der spezifischen Nukleinsäuresequenzabschnitte (16S ribosomales RNA Gen) für die im internen Mikrobiom Standard enthaltenen Bakterienspezies *Rhizobium radiobacter* (Plasmidstandard pGEM\_Rhizobium\_16S, in den Verdünnungsstufen  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ), *Salinibacter ruber* (Plasmidstandard pGEM\_Salinibacter\_16S, mit den Verdünnungsstufen  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ) und *Alicyclobacillus acidiphilus* (Plasmidstandard pGEM\_Alicyclobacillus\_16S, in den Verdünnungsstufen  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ) erfolgte mit LightCycler PCR-Protokollen in drei separaten Ansätzen. Die Amplifikation mit den sequenzspezifischen Primerpaaren erzeugten Amplifikate mit der Größe von 71 bp (*Rhizobium radiobacter*), 406 bp (*Salinibacter ruber*) und 260 bp (*Alicyclobacillus acidiphilus*). Die Detektion der PCR-Produkte erfolgte mit speziesspezifischen fluoreszenz-markierten *TaqMan*-Sonden. Die Amplifikation spezifischer DNA Abschnitte erfolgte durch Anlagern (*Annealing*) von spezifischen *Primern*. Die erregerspezifischen fluoreszierenden Sonden (TIB Molbiol) banden an die Zielsequenzen und bei Anwesenheit DNA des Internen Mikrobiom Standards im Reaktionsansatz kam es während der Elongationsphase der PCR zu einem messbaren Anstieg der Fluoreszenzemission (Amplifikationskurve).



## 2. Material und Methoden

### 2.26.5 Amplifikation von DNA-Präparationen

Die speziesübergreifende (sog. *broad-range*) Bakterien 16S rDNA-PCR erfolgte mit einem Blockcycler PCR-Protokoll. Es wurden jeweils 25 ng *Template-DNA* eingesetzt. Die PCR wurde mit 30 Zyklen (Annealing 64 °C 45 sec, Elongation 45 s) durchgeführt. Die Amplifikation mit den sequenzspezifischen *Primern* (16S-P4 und P5\_MIDx *final* 0,088 µM) erzeugte ein Amplifikat der Größe von 790 bp. Zur späteren Analyse der Zusammensetzung des Mikrobioms mit „*Next Generation Sequencing*“ -Verfahren (454/Pyrosequencing) wurden Primer verwendet, die eine probenspezifische Multiplex Identifier (MIDs), einen Lib-L Titanium Adapter sowie eine Key Sequenz aufweisen.



**Abbildung 2: NGS probenspezifische Multiplex Identifier (MIDs).**

Im Anschluss an die PCR-Reaktion wurden die Amplifikationsprodukte im Rahmen einer Agarosegelelektrophorese analysiert und auf PCR-Produkte der erwarteten Größe hin untersucht. Die Aufreinigung der Amplifikate erfolgte durch Gelextraktion und Reinigung mit AmPureXP *Beads* bevor diese zur Analyse der Mikrobiota der DNA-Sequenzierung mit dem GS FLX+ System zugeführt wurden.

### 2.26.6 Aufreinigung von DNA-Präparationen mittels präparativem Agarosegel

Die DNA-Präparationen wurden gelelektrophoretisch in 1,5 %igen Agarosegelen in einem TAE-Puffersystem (50 x TAE; 2 M Tris, 50 mM EDTA, 1 M Eisessig, pH 8,2) aufgetrennt. Die Proben wurden hierfür mit 6 x DNA-Ladepuffer versetzt. Als Referenz wurde eine Mischung von DNA-Fragmenten definierter Größe (100 bp) mitgeführt. Der Gellauf erfolgte bei einer Spannung von max. 10 V/cm Gellänge. Anschließend erfolgte eine 20-minütige Inkubation des Gels in wässriger Ethidiumbromid-Lösung. Die präparative Auswertung und Dokumentation erfolgte auf einer Geldokumentationsanlage (BioRad, München). Zur Rückgewinnung gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA wurden die entsprechenden

## 2. Material und Methoden

Banden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Hersteller-Protokoll eluiert.

### 2.26.7 Reinigung von Nukleinsäurefragmenten mit AMPureXP Beads

In Gegenwart von Polyethylenglycol (PEG) und einem salzhaltigen Puffer (2,5 M NaCl) binden DNA-Fragmente an die Oberfläche der AMPureXP *Beads* (Beckmann-Coulter). Diese *Beads* haben paramagnetische Eigenschaft und können mit Hilfe eines Magneten aus einer Suspension abgetrennt werden. Somit können DNA-Fragmente aus einer Lösung entzogen und in einen anderen Puffer überführt werden. Durch den Wechsel zu einem Puffer mit niedriger Salzkonzentration wird die Bindung der DNA-Fragmente an die *Bead*-Oberfläche aufgehoben, die DNA-Fragmente gehen in Lösung und die *Beads* können magnetisch abgetrennt werden. Die Konzentration von PEG in der Lösung beeinflusst die Bindung von DNA-Fragmenten an die AMPureXP *Beads* in Abhängigkeit von der Fragmentgröße. Eine Erhöhung des Verhältnisses Volumen *Beads*:Volumen DNA-Lösung führt dazu, dass kleinere DNA-Fragmente noch in das aufgereinigte Eluat gelangen, während eine Erniedrigung des Verhältnisses zum Abtrennen kleinerer DNA-Fragmente genutzt werden kann. Im ersten Schritt wurden 22,5 µl *Molecular Biology Grade Water* (Merck) mit 22,5 µl PCR-Produkt in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf) zusammen pipettiert. Nach Zugabe von 72,0 µl AMPure *Beads* wurde die Suspension 5 sec gevortext und für 10 min bei RT inkubiert. Die Reaktionsgefäße wurden in einem *DynaMag™-2 Magnetic Particle Concentrator* (MPC) Magnetständer (life technologies, Darmstadt) für 5 min bei RT inkubiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Daraufhin wurden die Cups aus dem MPC genommen, die *beads* mit 200 µl 70 % Ethanol (EMSURE Ethanol 100 % (Merck), mit *Molecular Biology Grade Water* frisch angesetzt) versetzt, für 5 sec gevortext, erneut 1 min im MPC inkubiert und der Überstand verworfen. Dieser Ablauf wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurden die *Tubes* im geöffneten Zustand so lange bei 37 °C im Thermomix inkubiert, bis das *Bead*-Pellet vollständig getrocknet war. Zum Lösen der DNA wurden 10 µl 1 x Tris-EDTA (TE) Solution (Fisher Scientific) zugegeben, die Proben 5 sec (oder bis zur vollständigen Lösung des Pellets) gevortext und für 2 min bei RT im MPC inkubiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in ein frisches DNA-LoBind *Tube*, 1,5 ml (Eppendorf) übertragen. Die aufgereinigten Amplikons wurden bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C eingelagert.

### 2.26.8 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen mittels PicoGreen Assay

Das Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagenz (Molecular Probes/Invitrogen) ist ein Cyaninfarbstoff, der in ungebundener Form nicht fluoresziert, bei der Bindung an dsDNA jedoch eine mehr als 1000-fache Fluoreszenzverstärkung aufweist. PicoGreen ist 10.000-

## 2. Material und Methoden

mal empfindlicher als UV-Absorptionsverfahren und hoch selektiv für dsDNA. Die Durchführung der Messung wurde wie im Herstellerprotokoll beschrieben durchgeführt.

### 2.26.9 Konzentrationsbestimmung mittels KAPA Library Quant Kit

Mit Hilfe von *Primern*, die an die sog. Titanium Lib-L Adaptorsequenzen von für Roche Next-Generation Sequenzierung vorbereiteten DNA-Libraries binden, werden diese im LightCycler 480 amplifiziert. Der KAPA Library Quant Kit baut auf den KAPA SYBR FAST qPCR Kit auf, der enthaltene Farbstoff (SYBR-Green Derivat) interkaliert in doppelsträngige DNA-Moleküle. Somit wird mit Fortschreiten der Amplifikation mit jedem Zyklus ein stärkeres Fluoreszenzsignal erhalten. Die im Kit enthaltenen DNA-Standards mit unterschiedlichen Konzentrationen von 460 bp großen DNA-Fragmenten mit Titanium Adaptoren dienen zur Erstellung einer Standardkurve. Anhand der Amplifikationsschwellenwerte (*Crossing-Points* bzw. *Cycle Threshold*), die von der LightCycler 480 Software ermittelt werden, kann eine Standardgerade ermittelt werden. Diese Standardgeradenfunktion ermöglicht dann das Umrechnen der Amplifikationsschwellenwerte der Probenmoleküle in einen Konzentrationswert. Vorteil dieser Methode gegenüber einer reinen Fluoreszenzmessmethode ist, dass nur aktive, amplifizierbare Moleküle erfasst werden und somit ein besserer Rückschluss auf das Verhalten der DNA-Bibliothek in der Emulsions-PCR möglich ist.

### 2.26.10 Emulsions-PCR für die Sequenzierung mit dem GS FLX+ System

Die Next-Generation Sequenzierung mit dem FLX+ System der Firma Roche LifeScience bedient sich der Räumlichen Trennung und klonalen Amplifikation einzelner DNA-Moleküle. Hierzu werden DNA-Moleküle an der Oberfläche von ca. 25 µm großen Kügelchen („*Beads*“) immobilisiert, wobei das Mischungsverhältnis DNA-Moleküle: *Beads* so gewählt wird, dass statistisch ein einzelnes DNA-Molekül an ein *Bead* bindet. Die *Beads* werden dann in die wässrige Phase einer Öl-in-Wasser Emulsion eingebracht, so dass jedes *Bead* sich in einem eigenen Reaktionsraum befindet und das angelagerte DNA-Fragment in einer PCR-Reaktion („Emulsions-PCR“) klonal amplifiziert wird. Nach der Emulsions-PCR wird die Emulsion gebrochen und DNA-haltige *Beads* werden über einen spezifischen *Primer*, der an sog. *Capture-Beads* immobilisiert ist angereichert, da nur ein relativ geringer Anteil der *Beads* anfänglich tatsächlich DNA-Moleküle gebunden hat. Die angereicherten DNA-haltigen *Beads* werden dann der Sequenzierung mit dem GS-FLX+ Sequenziersystem zugeführt. Die methodische Durchführung der Emulsions-PCR erfolgte nach den Angaben des Herstellers gemäß „emPCR Amplification Method Manual - Lib-L LV (XL+ & XLR70 (Version Juni 2013))“ nach dem XL+ Protokoll.

## 2. Material und Methoden

### 2.26.11 Next-Generation Sequenzierung mit dem GS FLX+ System

Die angereicherten DNA-haltigen *Beads* aus der Emulsions-PCR werden auf eine sogenannte Pico Titer Platte (PTP) aufgebracht. Die PTP enthält an ihrer Oberfläche ca. 3 Mio. Vertiefungen von ca. 29 µm Durchmesser. Dadurch kann jeweils nur ein DNA-*Bead* in eine Vertiefung gelangen. Auf dem Roche GS FLX+ System erfolgt die eigentliche Sequenzierung nach dem Pyrosequencing-Prinzip. Nach einer vorgegebenen Reihenfolge werden in die Reaktionskammer mit der PTP die einzelnen Desoxynukleotide Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin als Lösung von einem Fluidiksystem zudosiert. Die im Reaktionsraum vorhandene Polymerase versucht den vom Sequenzierprimer ausgehenden DNA-Strang doppelsträngig aufzufüllen. Passt das zugegebene Nukleotid an der Stelle an der die Polymerase sich gerade aufhält, so wird es eingebaut und dabei in Molekül Pyrophosphat freigesetzt. Das Enzym Sulfurylase erzeugt daraus Adenosintriphosphat (ATP), dieses wiederum wird vom Enzym Luciferase unter Freisetzung von Licht hydrolysiert. Eine hochauflösende Kamera registriert die Lichtsignale von der PTP. Die aufgezeichneten Bilder werden nach dem Lauf von einer Software analysiert und für die einzelnen Positionen der PTP daraus die Sequenz des ursprünglich auf dem entsprechenden *Bead* angelagerten DNA-Fragments ermittelt. Die methodische Durchführung der Next Generation Sequenzierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers gemäß „Sequencing Method Manual (GS FLX+ XL+) (Version Juni 2013)“ nach dem XL+ Protokoll.

### 2.26.12 Datenanalyse

Die Analyse von mikrobiellen Gemeinschaften mittels *Next Generation Sequencing* (NGS)-Verfahren basiert auf der Hochdurchsatz DNA-Sequenzanalyse von universellen Markergenen (zum Beispiel von PCR-Amplifikaten des 16S ribosomalen RNA Gens). QIIME (*Quantitative Insights into Microbial Ecology*) ist ein Open Source Software Paket zur bioinformatischen Analyse von Mikrobiom-Sequenzdaten. Die Datenauswertung zur Mikrobiom-Analyse beinhaltet<sup>69</sup> die Qualitätskontrolle der NGS-Rohdaten, das *Clustern*<sup>70</sup> von sogenannten „*Operational Taxonomic Units*“ (OTUs)<sup>71</sup>, der taxonomischen Zuordnung durch Abgleich mit 16S RNA Referenzdatenbanken<sup>72</sup>, der Konstruktion von phylogenetischen Bäumen und eine statistische Analyse<sup>73</sup> zur Alpha- und Beta-Diversität des analysierten Sequenzdatensatzes. Zur Auswertung und Datenanalyse wurde QIIME in der Version 1.8.0 verwendet. Die Sequenz-Rohdaten als sff-Datei wurden mit Hilfe des `split_libraries` Befehls nach probenspezifischer MID getrennt. Zusätzlich wurden DNA-Sequenzen entfernt, die außerhalb des Bereichs von 400-800 Bp lagen. DNA-Sequenzen, die einen mittleren Qualitätswert von 25 unterschritten, die mehr als 6 Homopolymere oder nicht klar zuordenbare („N“) Basen enthielten. Sequenzen mit einem Qualitätswert von weniger als 35 in einem gleitenden Fenster von 50 Bp wurden getrimmt. Anschließend wurden chimäre 16S rDNA Sequenzen aus dem Datensatz mit Hilfe des UCHIIME-

## 2. Material und Methoden

Algorithmus entfernt. Die DNA-Sequenzen, welche die vorhergehenden Qualitätskontrollschritte passiert haben, wurden mit Hilfe des USEARCH-Algorithmus (Version 6.1) nach einem „de novo“-Verfahren in OTUs (Operational Taxonomix Units) geclustert. Die Berechnung der Alpha- und Beta-Diversität und deren graphische Darstellung erfolgte nach dem „core\_diversity\_analysis“ Protokoll der QIIME 1.8.0-Software mit den versionsinternen Standard-Algorithmen.

### 2.2.27 Organentnahme bei Versuchstieren

Die Organentnahme erfolgte stets am abgetöteten Tier. Für mRNA- und Proteinuntersuchungen wurden die Organe vor Entnahme perfundiert. Hierfür wurde zunächst Herzblut entnommen, anschließend der rechte Vorhof abgetrennt und der gesamte Kreislauf mit einer 10 ml *Soft-Ject* Spritze und einer BD Microlance-Kanüle (27 G 3/4 0,4x19 mm), über die linke Herzkammer mit ca. 40 ml sterilem PBS gespült. Nach vollständiger Entfärbung der Organe wurden diese entnommen und halbiert. Für RNA-Analysen wurden die Gewebehälften in 350 µl RNAlater Lösung ÜN bei 4 °C und abschließend bei -70 °C gelagert. Für Proteinanalysen wurden die anderen Hälften in flüssigem Stickstoff schockgefroren und ebenfalls bei -70 °C gelagert. Zur Untersuchung von Knochenmark wurden Ober- und Unterschenkelknochen freipräpariert und aus den Gelenken gelöst. Die von Muskel- und Bindegewebe gesäuberten Knochen wurden in Petrischalen mit PBS gegeben. Die Enden der Knochen wurden mit einer feinen Schere abgeschnitten, an einem Ende die Spitze einer Kanüle angesetzt, das Knochenmark mit ca. 1 ml PBS ausgespült und in einem 15 ml Reaktionsgefäß (BD Falcon) gesammelt. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 300 x g für 8 min bei RT, wurde das Pellet in 1000 µl PBS resuspendiert und zu je 500 µl aliquotiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der ÜS abgenommen, das Pellet für RNA-Analysen in 350 µl RLT-Puffer bei -70 °C gelagert und das Pellet für die Proteinmessungen in flüssigem Stickstoff eingefroren und ebenfalls bei -70 °C gelagert. Für die Herstellung von ER-Hoxb8-Knochenmarksstammzellen, wurde das Knochenmark gewonnen. Bei experimentellen Lungeninfektionen erfolgte die Organentnahme zur Bestimmung der Bakterienlast. In diesem Fall wurden die Organe entnommen und in 2 ml *Safe-Lock* Tubes (Eppendorf) eingewogen. Nach Zugabe von 1000 µl sterilem PBS und einer Edelstahlkugel (Ø 5 mm) erfolgte der Aufschluss in einem *Tissue Lyser* (Qiagen) für 5 min bei 30 Hz. Die Suspension wurde bis zur Bestimmung der Bakterienlast auf Eis gelagert. In allen durchgeführten Kolitis-Modellen wurden die Organe, wie im Folgenden beschrieben entnommen und aufgearbeitet. Am 7. (akutes Modell), 13. (akut mit Regeneration) bzw. 77. (chronisches Modell) Tag nach Versuchsbeginn wurden die Tiere gewogen und getötet. Mittels einer medianen Inzision wurde die Bauchhöhle eröffnet. Nach Aufsuchen des ileozökalen Übergangs wurde das terminale Ileum durchtrennt, Zäkum und Kolon entwunden und vom Mesenterium getrennt. Alle

## 2. Material und Methoden

ersichtlichen mesenterialen Lymphknoten wurden entnommen, gesäubert und bis zur weiteren Aufarbeitung in RPMI Medium gelagert. Nach paramedianem Durchtrennen des Beckenringes wurde das distale Kolon bis zum Anus freipräpariert und mit einem perianalen Fellring entnommen. Das Zäkum-Kolon-Präparat wurde entwunden und die Kolonlänge ohne Zäkum vermessen. Das gesamte Präparat wurde von Stuhl befreit, wobei der Inhalt des Zäkums in 2 ml *Safe-Lock Tubes* in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -70 °C gelagert wurde. Danach wurde der distale Bereich längs an der Mesenterialwurzel mit einer Speicheldrüsenschere circa 1 cm weit eröffnet. Die anschließenden circa 0,5 cm wurden als Rohr belassen, in Einbettschälchen (Cryomold, 15x15x15 mm, DiaTec, Hallstadt) aufgestellt, mit Tissue-Tek überschichtet und langsam in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur Aufarbeitung wurden die Proben bei -70 °C gelagert. Vom verbliebenen Kolon wurden weitere 2 cm eröffnet. Zwei Stücke wurden für RNA-Analysen in 350 µl RNeasy-Lösung ÜN bei 4 °C inkubiert und anschließend bei -70 °C eingelagert. Für Western Blots wurden weitere zwei Stücke in flüssigem Stickstoff schockgefroren und ebenfalls bei -70 °C gelagert. Das verbliebene Zäkum-Kolon-Präparat wurde zu einer Schnecke eingerollt mit dem distalen Teilstück in 4 % Paraformaldehyd fixiert. Zur weiteren Fixierung wurden die Proben an die Pathologie der Universität Regensburg übergeben und dort in Paraffin eingebettet. Abschließend wurden serielle Schnitte (Schichtdicke 1 bis 2 µm) angefertigt. Die einzelnen Schnitte wurden zur Entfernung des Paraffins in Xylol gewaschen, in einer absteigenden Ethanolreihe entwässert und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

### 2.2.28 pGEM-Teasy Vektor System

Die pGEM®-T und die pGEM®-Teasy Vektorensysteme (Promega) sind Systeme für das Klonieren von PCR Produkten. Zur Klonierung in pGEM-Teasy werden weder das Fragment noch der Vektor durch Restriktionsenzyme geschnitten. Der Vektor liegt bereits linear vor. Das gewünschte Fragment wird über die Poly-A-Überhänge, welche bei der PCR entstehen, integriert. Die Durchführung der Klonierungen erfolgte laut Herstellerangaben.

### 2.2.29 Plasmid-DNA Isolierung aus Bakterien

Die Extraktion von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte für analytische Zwecke mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Zur Gewinnung größerer Plasmid-Mengen für präparative Zwecke wurde das QIAprep Plasmid Midiprep Kit verwendet. Die Durchführung erfolgte in beiden Fällen laut Herstellerprotokoll.

### 2.2.30 Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode, um spezifische DNA-Fragmente *in vitro* zu amplifizieren. Dabei wird eine ds-Matrizen-DNA (*template*) in mehreren Zyklen hitzedenaturiert, mit kurzen, spezifisch bindenden Oligonukleotiden (*Primer*, vorwärts und rückwärts am Matrizenstrang bindend) hybridisiert und der komplementäre Strang durch eine thermostabile DNA-Polymerase verlängert. Alle PCR-Reaktionen wurden in 20 µl oder 40 µl Ansätzen in einem Thermocycler (Biorad, München) durchgeführt. Die *Primer* wurden dabei in einer 1:10 Verdünnung pro Reaktion zusammen mit 2,5 mM dNTPs (Invitrogen), 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 10 x PCR Puffer ohne MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen) und 2,5 U *PlatinumTaq Polymerase* (Invitrogen) eingesetzt. Als Matrize wurden etwa 100 ng Plasmid-DNA verwendet. Nach einer initialen Denaturierung für 5 min bei 95 °C folgten 35-50 Zyklen. Jeder Zyklus begann mit 30 sec Denaturierung bei 95 °C, gefolgt von 45 sec Anlagerung der *Primer* bei der jeweils spezifischen Temperatur (siehe Tab.) und einer Elongationsphase in Abhängigkeit der Amplikonlänge (60 sec pro 1.000 bp) bei 72 °C. Nach dem letzten Zyklus fand eine abschließende Elongation für 7 min bei 72 °C statt, woraufhin die Temperatur bei 4 °C gehalten wurde. Die resultierenden Amplifikate wurden durch Agarosegelelektrophorese analysiert und gegebenenfalls durch Gel-Extraktion präpariert.

### 2.2.31 Produktion von rekombinantem SCF (*stem cell factor*)

Zur Produktion von sezerniertem rekombinantem SCF wurden 3 x 10<sup>5</sup> stabil mit einem SCF-Expressionsvektor transfizierte CHO Zellen in 15 cm Zellkulturschalen (Greiner, bio-one, Frickenhausen) ausgesät. Beim Erreichen von 70 % Konfluenz, nach circa drei bis vier Tagen, wurde der Überstand abgenommen, für 5 min bei RT und 1000 x g zentrifugiert und mit 0,22 µm Filtern (BD Falcon, USA) sterilfiltriert. Der so erhaltene SCF-haltige Überstand wurde aliquottiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 2.2.32 Quantitative Echtzeit-PCR (*quantitative real-time PCR*, qPCR)

Die Messung von Transkriptmengen mittels quantitativer Echtzeit-PCR erfolgte an einem Sequence Detection System ABI-Prism 7900 HT (Life Technologies, Darmstadt) nach der *SYBR Green*-Methode mit dem *LightCycler 480 SYBR Green I Master* (Roche) oder dem *SYBR Select Master Mix* (Applied Biosystems). Hierbei wurden 2 µl der cDNA mit je 0,5 µl der spezifischen Primer, 5 µl des fertigen Reaktionsreagenzes sowie 2 µl Wasser versetzt und durch kurzes Zentrifugieren in eine 384-well Platte eingebracht. Nach einer initialen Denaturierung von 10 min bei 95 °C folgten 40 Amplifikationszyklen bestehend aus einer Denaturierungsphase bei 95 °C für 15 sec, Anlagerung der Oligonukleotide für 30 sec bei der jeweils spezifischen Anlagerungstemperatur und einer Elongationsphase für 15 sec bei

## 2. Material und Methoden

72 °C. Um die Spezifität der Reaktion zu überprüfen, wurde nach der letzten Amplifikation eine Schmelzkurve erstellt. Diese bestand aus 95 °C für 10 sec, gefolgt von 60 sec bei 65 °C und abschließenden 5 sec bei 97 °C. Die zunehmende Fluoreszenz in den Reaktionsansätzen bei erfolgreicher Vervielfältigung des *Targets* wurde dabei nach jeder Elongationsphase bestimmt und wurde mit der *SDS2.2*-Software (Applied Biosystems) analysiert. Hauptsächlich erfolgten relative Quantifizierungen verschiedener Gene zu einander. Die ermittelte Transkriptmenge wurde zudem stets auf die Expression des *housekeeping*-Gens HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase) normalisiert. Zur Berechnung der absoluten Kopienzahl in den Proben wurde eine 5-stufige Verdünnungsreihe eines Standardplasmids mitgeführt.

### 2.2.33 Retrovirale Transduktion – Infektion von Knochenmarkszellen

Auf die Knochenmarkszellen wurden je 3 ml des Virusüberstandes, gegeben. Die Platten wurden mit Saran-Folie umwickelt und für 3 h, bei 32 °C und 1300 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurden 3 ml Optimem (Gibco) angereichert mit SCF-Überstand (1:25) und Estradiol (Sigma-Aldrich, München) in einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben. Die so transduzierten Zellen wurden für 5 Tage bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 2.2.34 RNA-Präparation und cDNA-Synthese

Zur RNA-Isolation aus Zellkulturproben wurden die Zellen nach ihrer Ernte zunächst in 350 µl RLT-Puffer (Qiagen) resuspendiert und zur späteren Aufarbeitung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C eingelagert. Gewebeproben wurden ebenfalls bereits in RLT-Puffer eingefroren und dann mechanisch in einem *Tissue-Lyser* (Qiagen) für 5 min bei 30 Hz aufgeschlossen. Unlösliche Bestandteile wurden für 5 min bei 500 x g und 4 °C abzentrifugiert. Zum Aufschluss von Zellresten und zur Scherung störender genomischer DNA wurden die Proben auf eine *QIAshredder* (Qiagen) Säule aufgetragen. Zur weiteren RNA-Präparation wurde das *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) gemäß Herstellerangaben verwendet. Die RNA wurde in einem Spectrophotometer auf Reinheit und Konzentration analysiert und anschließend bei -70 °C bis zur weiteren Verwendung eingelagert. Zur cDNA-Synthese (*complementary DNA*) wurde das *iScript Advanced cDNA Synthesis Kit* (BioRad) laut Herstellerangaben verwendet. Für die 20 µl Ansätze wurden je 4 µl 5x *iScript reaction mix*, 1 µl *iScript reverse transcriptase* und 1 µg des jeweiligen *RNA Templates* eingesetzt, bevor mit RNase freiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt wurde. Anschließend wurden die Ansätze für 5 min bei 25 °C gefolgt von 30 min bei 42 °C zur Reversen Transkription und 5 min bei 85 °C zur Inaktivierung des Enzyms in einem Thermocycler (Biorad, München) inkubiert. Die cDNAs wurden bei -20 °C eingefroren.



## 2. Material und Methoden

### 2.2.35 Statistische Auswertungen

Statistische Analysen von Datensätzen wurden mit der Software *GraphPad Prism v6.0* durchgeführt. Die Auswertung erfolgte in der Regel durch Mann Whitney Tests. *Survival*-Experimente wurden als Kaplan-Meier-Kurven dargestellt und mittels *Logrank test* analysiert. Die Anzahl der jeweils durchgeführten Experimente bzw. der untersuchten Versuchstiere ist den Abbildungen zu entnehmen.

### 2.2.36 Stimulation von T-Zellen aus mesenterialen Lymphknoten

Die mesenterialen Lymphknoten (mesenteric lymph nodes, MLNs) wurden wie unter Punkt beschrieben entnommen und in RPMI Medium überführt. Diese wurden in eine Petrischale überführt und mit einem Spritzenstempel (10 ml Softject) zerdrückt. Zur weiteren Aufarbeitung wurde die Suspension durch ein 100 µm Zellsieb in ein 50 ml Schraubdeckelgefäß (BD Falcon) überführt. Die Suspension wurde für 15 min bei 300 x g zentrifugiert, in 10 ml RPMI-Medium (10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % Glutamin) resuspendiert und erneut durch ein 100 µm Zellsieb in ein frisches 50 ml Röhrchen überführt. Nach Bestimmung der Zellzahl, mittels Neubauer-Zählkammer, unter Verwendung von Trypanblau, wurden 5 Mio. Zellen in ein 15 ml *Tube* (BD Falcon) überführt und für 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml RPMI resuspendiert. Die Stimulation der T-Zellen erfolgte mit 200 µl Zellsuspension pro Napf einer 96-*well*-Platte ÜN bei 37 °C. Die Stimulationen erfolgten jeweils in 16-facher Ausführung. Es verblieben jeweils 8 *wells* unstimuliert während 8 *wells* restimuliert wurden. Hierfür wurden die Näpfe zuvor ÜN mit aCD3 gekoppelt und vor Gebrauch mit 200 µl PBS gewaschen. Die Überstände wurden in frische Platten überführt und bis zur Vermessung im Luminex-System bei -20 °C eingefroren.

### 2.2.37 Stimulation von neutrophilen Granulozyten

Für die Freisetzung von *Bactericidal/Permeability Increasing* Protein (BPI) aus humanen Granulozyten wurde Spendern 9 ml Blut in EDTA-Röhrchen entnommen und dieses bis zur Stimulation bei RT gelagert. Zur Bestimmung des Gesamtgehalts an BPI dienten *freeze/thaw*-Proben. Hierfür wurden 400 µl RPMI-Medium zu jeweils 100 µl Blut pipettiert, die Proben dreimal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und jeweils bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 4 °C und 300 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die Stimulationen wurden stets 100 µl Vollblut in Polypropylenrundbodenröhrchen eingesetzt. Die Proben wurden mit 200 µl Cytochalasin B, in einer Endkonzentration von 5 µg/ml für 5 min bei 37 °C vorstimuliert. Neben den stimulierten Proben wurden auch unbehandelte Proben zur Kontrolle mitgeführt. Die fMLP-

Stimulation wurden in drei verschiedenen Konzentrationen (0,5  $\mu$ M; 1,0  $\mu$ M; 1,5  $\mu$ M) über zwei Zeiträume (60 und 90 min) bei 37 °C durchgeführt. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Proben bei 300 x g für 8 min und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden bis zu Messung im Luminex-System bei -70 °C gelagert.

### **2.2.38 Transformation chemisch kompetenter *E. coli***

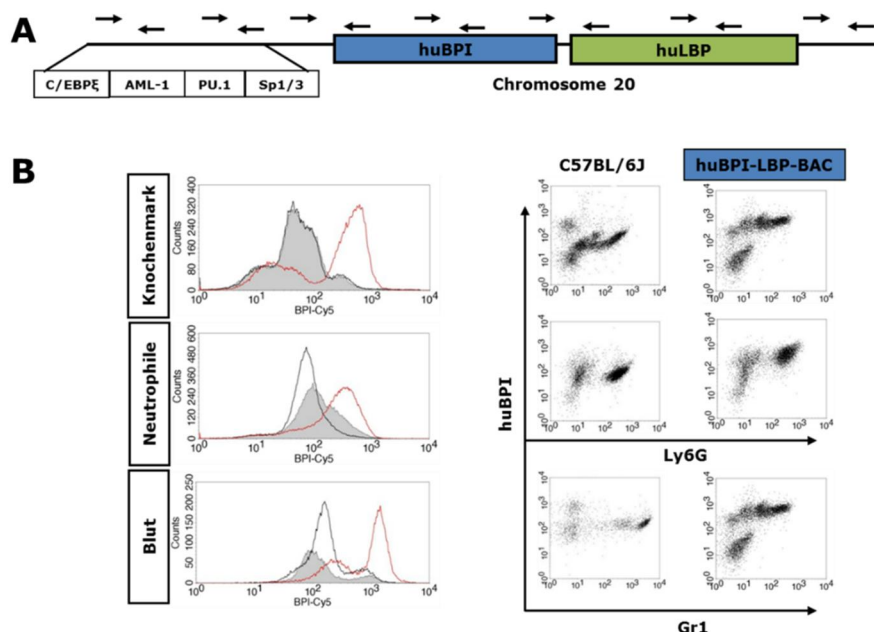
Zur Transformation mit Plasmid-DNA wurden 100  $\mu$ l chemisch kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit 2  $\mu$ l Plasmid-DNA vermischt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 4 °C wurden diese Zellen einem 45 sec dauernden Hitzeschock, in einem Thermomixer (Eppendorf) bei 42 °C ausgesetzt, was zur Aufnahme der angelagerten DNA in die Zellen führt. Nachdem der Transformationsansatz 2 min auf 4 °C abgekühlt worden war, erfolgte die Zugabe von 900  $\mu$ l vorgewärmten LB-Medium. Zur Regeneration der Zellen und Expression der auf dem eingebrachten Plasmid kodierten Resistenzen wurde der Ansatz 1,5 h bei 37 °C und 220 rpm im Horizontalschüttler (Heidolph) inkubiert. Zur Maximierung der Ausbeute erfolgte die Inkubation in 14 ml Polypropylen-Rundbodenröhrchen (Nunc). 10  $\mu$ l des Ansatzes wurden direkt verwendet, der restliche Ansatz wurde bei 13.000 x g, 1 min bei RT abzentrifugiert. Die Zellen wurden im Rücklauf resuspendiert und auf einer LB-Agar-Platte mit Ampicillin (100  $\mu$ g/ml) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte ÜN bei 37 °C.

### 3. Ergebnisse

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung der für BPI und LBP humanisierten Mauslinie – Regulationsmechanismen und Konzentrationsverhältnisse von BPI und LBP

Ziel dieser Arbeit war es die von Funktion des *Bactericidal/permeability increasing protein* (BPI) detailliert zu untersuchen. Ein Großteil dieser Untersuchungen sollte auf Tierversuchen basieren. Da die Expression und Funktion von murinem BPI jedoch nicht mit der des humanen Proteins vergleichbar ist, wurde in Vorarbeiten eine für BPI und LBP humanisierte Mauslinie generiert. Die generierte Mauslinie ist eine BAC-transgene Linie. Das *bacterial artificial chromosome* (BAC) ist ein Vektor basierend auf einem *functional fertility plasmid* (F-plasmid), welcher größere Genomabschnitte mit bis zu 300 kb aufnehmen kann. In diesem Fall wurde ein 170 kb großes BAC-Fragment mittels Mikroinjektion in Pronuklei befruchteter C57BL/6J Oozyten eingebracht. Das Konstrukt enthielt ein Teilstück des humanen Chromosom 20, mit den Genen für humanes BPI, humanes LBP und deren Promotoren (C/EBP $\epsilon$ , AML-1, PU.1, Sp 1/3). Um ausschließlich die Expression der humanen BPI-Variante untersuchen zu können, wurden diese Tiere mit den bereits vorhandenen BPI KO-Mäusen verpaart. Die entstandene transgene Mauslinie besitzt somit statt murinem humanes BPI und beide LBP-Formen.



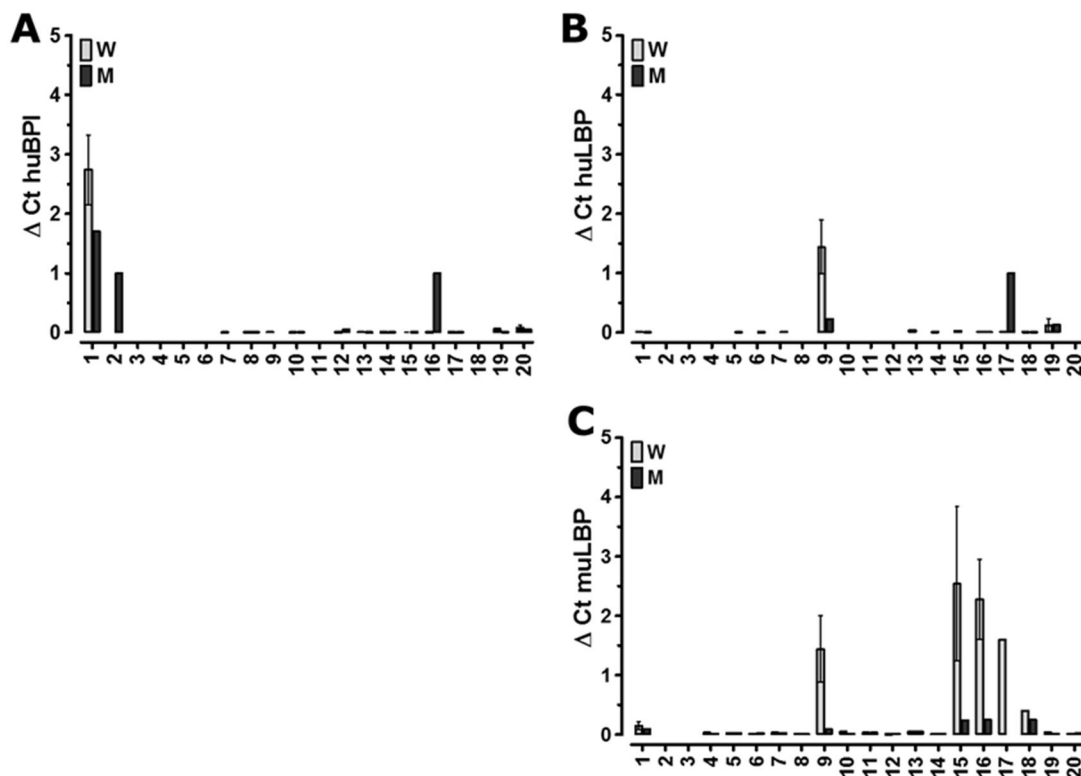
**Abbildung 3: Strategie der für BPI und LBP humanisierten Mauslinie (BPI-LBP-BAC-Maus).**

Schematische Darstellung des BAC-Transgens (A), mit den Genen für humanes BPI und LBP, sowie deren Promotoren. Nachgewiesen wurde die Zelltyp-spezifische Expression von humanem BPI (B) im Knochenmark, neutrophilen Granulozyten und dem Blut. Abbildung modifiziert nach Alexander Holweg (Promotion, Universität Erlangen, 2010).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1.1 Basales Expressionsmuster von BPI und LBP auf mRNA- und Protein-Ebene

Die für BPI und LBP humanisierte Mauslinie sollte als Modellorganismus in verschiedenen *in vivo* Modellen eingesetzt werden, um die Regulationsmechanismen und Konzentrationsverhältnisse von BPI und LBP detailliert untersuchen zu können. Die Generierung einer humanisierten Mauslinie war von großer Bedeutung, da sich die Expressions- und Regulationsmechanismen von murinem und humanem BPI deutlich unterscheiden. Es musste sichergestellt werden, dass sich die generierte Mauslinie als Modellorganismus eignet. Hierfür wurden zunächst die Expressionsmuster von BPI und LBP sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene in den verschiedenen Geweben untersucht.

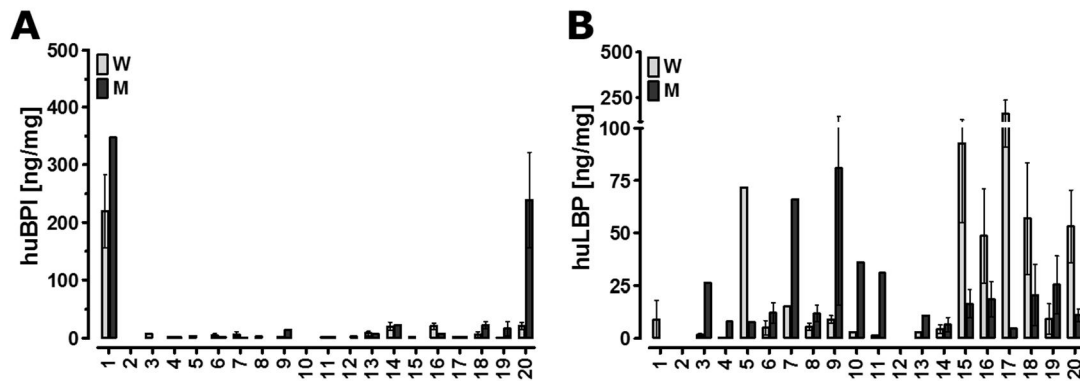


**Abbildung 4: Die mRNA-Expression von BPI und LBP in der transgenen Maus entspricht dem Expressionsmuster beider Gene im humanen System.**

Aus den entnommenen Geweben (1, Knochenmark; 2, Blut; 3, Haut; 4, Rektum; 5, Colon ascendens; 6, Caecum; 7, Terminales Ileum; 8, Magen; 9, Leber; 10, Herz; 11, Schilddrüse; 12, Gehirn; 13, Lymphknoten; 14, Thymus; 15, Harnblase; 16, Hoden/Uterus; 17, Samenleiter/Eierstöcke; 18, Lunge; 19, Niere; 20, Milz) wurde die Gesamt-RNA paräpariert, revers transkribiert und mittels spezifischer *Primer* in einer qRT-PCR die humane BPI- und LBP-Transkriptmenge normalisiert auf das *Housekeeping*-Gen Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) analysiert (A, B). In gleicher Weise wurde die Transkriptmenge für murines LBP bestimmt (C). Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM aus zwei unabhängigen Experimenten, mit einem und vier Tieren. Um die Spezifität der *Primer* nachzuweisen wurden Wildtyp-Mäuse als Kontrollen mitgeführt.

### 3. Ergebnisse

Die Organe wurden wie unter Punkt beschrieben entnommen und aufgearbeitet. Für die Untersuchung auf mRNA-Ebene wurden jeweils 1 µg extrahierte RNA in cDNA umgeschrieben und mittels qRT-PCR analysiert. Die zu untersuchenden Gene wurden anhand spezifischer *Primer* amplifiziert und mit der  $\Delta\Delta$ CT-Methode auf ein *housekeeping*-Gene (HPRT-1) normiert. Die erhaltenen Daten wurden analysiert und sind in Abbildung 4 dargestellt.



**Abbildung 5: Die Protein-Expression von BPI und LBP in der transgenen Maus entspricht dem Expressionsmuster beider Proteine im humanen System.**

Aus den entnommenen Geweben (1, Knochenmark; 2, Blut; 3, Haut; 4, Rektum; 5, Colon ascendens; 6, Caecum; 7, Terminales Ileum; 8, Magen; 9, Leber; 10, Herz; 11, Schilddrüse; 12, Gehirn; 13, Lymphknoten; 14, Thymus; 15, Harnblase; 16, Hoden/Uterus; 17, Samenleiter/Eierstöcke; 18, Lunge; 19, Niere; 20, Milz) wurde Gesamt-Protein isoliert, der Proteingehalt mittels BCA-Test bestimmt und die Proteinmenge für humanes BPI und LBP im Luminex-System bestimmt und auf den Gesamtproteingehalt normiert (A,B). Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM aus zwei unabhängigen Messungen mit je einem und vier Tieren. Zur Kontrolle wurden Proben aus Wildtyp-Tieren mitgeführt um Kreuzreaktivitäten zu den murinen Proteinen auszuschließen. Die Konzentration von humanem LBP im Serum wurde ebenfalls bestimmt (C). Dargestellt ist der Mittelwert aus mehreren unabhängigen Messungen von mindestens 2 Tieren.

Weiterhin wurden die Expressionsmuster der beiden Gene auf Proteinebene untersucht. Hierfür wurden die Gewebe entsprechend der Anforderungen für das Luminex-System aufgeschlossen und anschließend vermessen. In Abbildung 5 sind die Ergebnisse graphisch aufgetragen. Die erhaltenen Expressionsmuster für humanes BPI und humanes LBP der transgenen Mäuse stimmten sowohl auf mRNA-, als auch auf Protein-Ebene mit dem publizierten Organ- bzw. Gewebespezifischen Expressionsmuster des Menschen überein. Auf mRNA-Ebene wird humanes BPI im Grundzustand fast ausschließlich im Knochenmark exprimiert. Humanes LBP wird hingegen verstärkt in Leber und Niere exprimiert, im weiblichen Organismus um ein Vierfaches erhöht, was mit publizierten Daten aus Analysen menschlicher Gewebe übereinstimmt<sup>61,73</sup>. Für murines LBP konnte ebenfalls die Expression in der Leber nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich hier jedoch auch eine deutliche Expression im Urogenitaltrakt beider Geschlechter. Dieses Expressionmuster wurde sowohl in den transgenen als auch in den Wildtypen festgestellt, in der Literatur ist hierzu allerdings bis dato nichts beschrieben. Die durchgeführten Expressionsanalysen auf

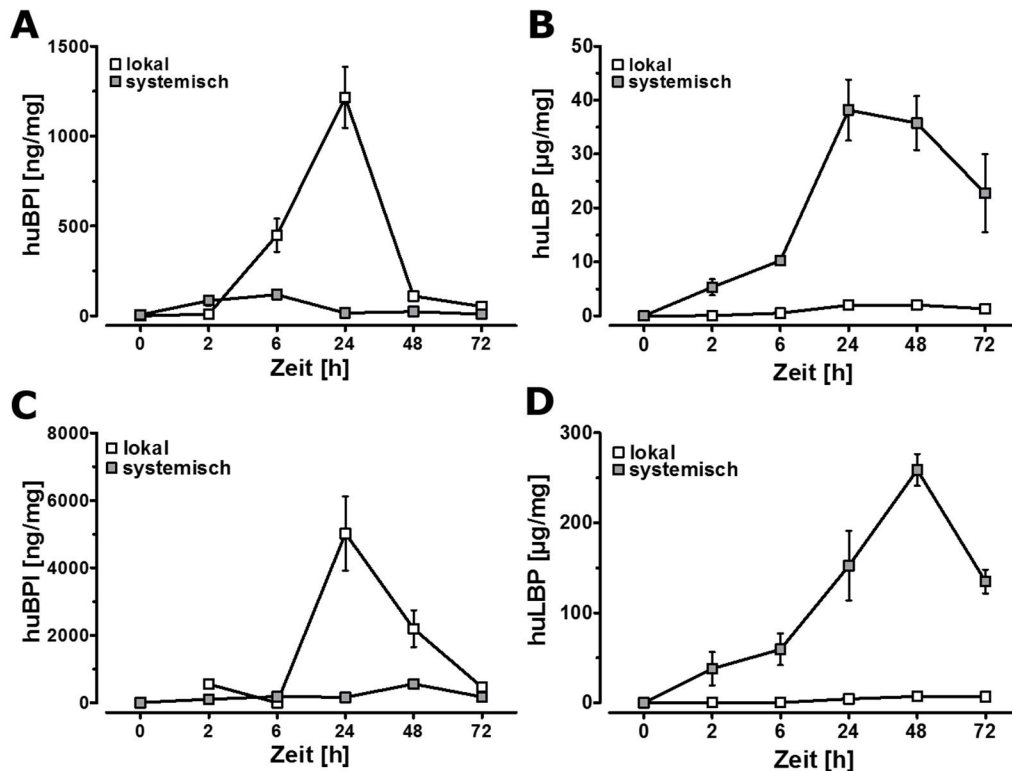
### 3. Ergebnisse

Proteinebene ergaben ähnliche Ergebnisse. Es wurden hohe humane BPI Konzentrationen ( $> 100$  ng/mg Gewebeprotein) in Knochenmark und Milz gemessen. Bei humanem LBP zeigten sich die höchsten Werte (ebenfalls  $> 100$  ng/mg Gewebeprotein), wie erwartet, in der Leber. Geringere LBP-Konzentrationen in anderen Geweben, sind mit großer Wahrscheinlichkeit auf Blutrückstände im Gewebe zurückzuführen, da eine vollständige Perfusion der Gewebe nicht umsetzbar ist und im Serum sehr hohe Konzentrationen von LBP vorliegen ( $94 \mu\text{g/ml}$ ). Auch hier zeigte sich, in Korrelation zu den mRNA-Daten, eine deutliche Expression des Proteins im Urogenitaltrakt.

#### **3.1.2 Expressionsregulation von BPI und LBP im zeitlichen Verlauf nach Infektionen**

Um die Expression von BPI und LBP und deren zeitliche Regulation nach Infektionen *in vivo* studieren zu können, wurde zunächst ein Maus-Infektionsmodell einer akuten Pneumonie etabliert, das sich durch eine starke Infiltration von neutrophilen Granulozyten in die unteren Atemwege auszeichnet. Hierzu wurden die Versuchstiere nach einer Isoflurannarkose intratracheal mit Grampositiven oder Gramnegativen Bakterien infiziert. Anschließend wurden die Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten abgetötet, Herzblut zur Serumgewinnung entnommen und eine bronchoalveolären Lavage (BAL) durchgeführt. Sowohl aus Serum als auch BAL-Flüssigkeit (BALF) wurde die Proteinmenge an humanem BPI und LBP im Infektionsverlauf mittels Luminex-System bestimmt.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 6: BPI und LBP zeigen unterschiedliche Regulationsmechanismen im zeitlichen Verlauf nach experimentellen Lungeninfektionen mit gramnegativen und grampositiven Bakterien.**

BPI-LBP-BAC-Mäusen wurden intratracheal mit  $2 \times 10^6$  CFU *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (PSAE) (A, B) oder  $5 \times 10^7$  CFU *Streptococcus pneumoniae* ATCC (SRPN) (C, D) infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Mäuse abgetötet, Herzblut (systemische Konzentrationen) entnommen und eine BAL (Bestimmung lokaler Konzentrationen) durchgeführt. Die Proteinmengen von BPI (A, C) und LBP (B, D) wurden im Luminex-System vermessen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM, von 5 (PSAE) und 4 (SRPN) Tieren pro Zeitpunkt.

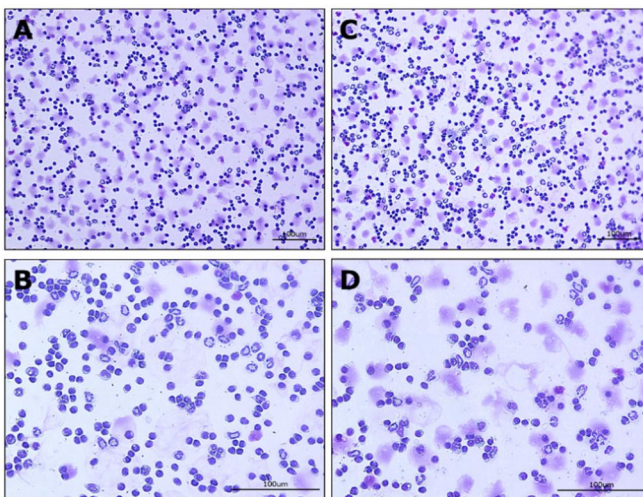
Ein deutlicher Unterschied in der lokalen (BALF) und systemischen (Serum) Regulation der beiden Antagonisten festgestellt werden. Während die Rolle von BPI in der Abwehr von gramnegativen Erregern bereits weitreichend beschrieben ist, zeigt sich in diesem Modell, dass auch grampositive Pneumokokken in der Lage sind *in vivo* die eine Immunantwort zu induzieren, bei der BPI deutlich verstärkt exprimiert wird und dadurch eine wichtige Funktion erfüllen könnte. Hierbei konnte lokal eine drastische Induktion der BPI-Expression, sowohl nach Infektion mit gramnegativen *P. aeruginosa*, als auch mit grampositiven *S. pneumoniae* Bakterien nachgewiesen werden (siehe Abb. 6). Lokal erreichte die BPI-Expression innerhalb von 24 Stunden ihren Höhepunkt, während die LBP-Expression am Entzündungsort kaum einen Anstieg zeigte. Systemisch hingegen zeichnet sich bereits nach 6 Stunden ein enormer Anstieg an LBP ab, der nach 24 (C) oder 48 (D) Stunden seinen Höhepunkt erreichte und im weiteren Verlauf wieder langsam abnahm während im Gegensatz dazu nur ein geringer BPI-Konzentrationsanstieg im Blut messbar war. Sowohl humanes BPI als auch LBP wurden in beiden Untersuchten Pneumoniemodellen drastisch im Infektionsverlauf induziert, wobei sich bei der lokalen

### 3. Ergebnisse

Verteilung deutliche Unterschiede zeigten. Während BPI vorwiegend im infizierten Gewebe der Lunge und damit eher lokal am Ort der Infektion exprimiert wird, ist LBP vorwiegend im Blut und damit im Gesamtorganismus nachweisbar. Beiden untersuchten Proteinen könnten somit wichtige Funktionen bei der Infektionsabwehr und der Regulation der Entzündungsreaktion nach Infektionen mit sowohl gramnegativen als auch grampositiven Bakterien zukommen. Des weiteren zeigen die erhobenen Befunde, dass sowohl BPI (lokal) als auch LBP (im Blut) als Parameter („Biomarker“) für ein akutes Infektions- bzw. Entzündungsgeschehen eingesetzt werden können, da sich ihre Expression im Verhältnis zueinander und zum Expressionsort deutlich und in Abhängigkeit vom Infektionszeitpunkt unterscheidet.

#### 3.1.3 Expression von humanem BPI in neutrophilen Granulozyten

Da die Expression von BPI beim Menschen nur in sehr wenigen definierten Zelltypen auftritt, sollte die generierte transgene Maus hinsichtlich der zell- und gewebespezifischen Expression des Transgens untersucht werden. Beim Menschen liegt das Ziel-Protein vorgespeichert in neutrophilen Granulozyten vor. Es wurde bereits gezeigt, dass dies in der Maus nicht der Fall ist, sondern die BPI-Expression erst nach Stimulation transkriptionell induziert wird. Es sollte zunächst daher untersucht werden, ob bei der neu etablierten, für BPI und LBP humanisierten Mauslinie BPI, wie im menschlichen Organismus, vorgespeichert in den Granula neutrophiler Granulozyten vorliegt. Hierzu wurde transgenen Mäusen Blut entnommen und zunächst Schnellfärbungen mittels DiffQuik-Färbung angefertigt, um die verschiedenen Leukozytentypen zu unterscheiden und morphologisch zu beurteilen.

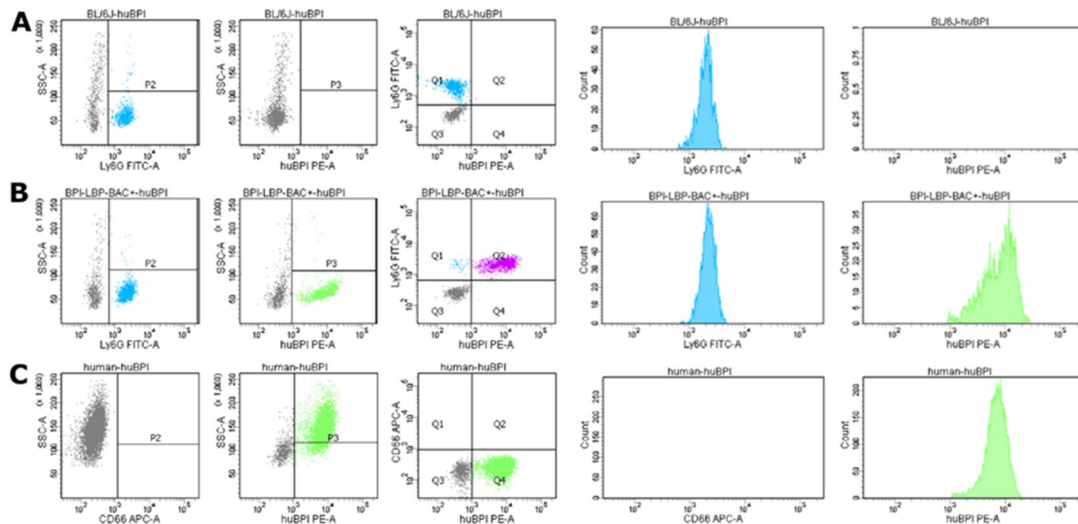


**Abbildung 7: Das Blutbild transgener Mäuse weist im Vergleich zu Wildtypmäusen keine unterschiedlichen Zellmorphologien auf.**

Nach Erythrozytenlyse wurden die Zellen durch Zytocentrifugation auf Objektträger aufgebracht und mittels der DiffQuik-Methode gefärbt. Zellen der für BPI und LBP humanisierten Mäuse (A) unterscheiden sich morphologisch nicht von Zellen der Wildtyp-Mäuse (B).



### 3. Ergebnisse



**Abbildung 8: Humanes BPI wird in neutrophilen Granulozyten transgener Mäuse vorgespeichert.**

Durchflusszytometrische Analysen von Blutzellen aus transgenen Mäusen (A), im Vergleich zu Wildtypen (B) und humanen Neutrophilen (C). Die Proben wurden intrazellulär auf humanes BPI gefärbt, zur Oberflächenfärbung von murinen Granulozyten diente der Marker Ly6G. Die Oberflächenfärbung von humanen Neutrophilen mit CD66 wurde durch die anschließende intrazelluläre Färbung zerstört. Transgene Mäuse wiesen eine starke BPI-Expression in der Ly6G-positiven Population auf. Humane Neutrophile zeigen ein vergleichbares BPI-Signal.

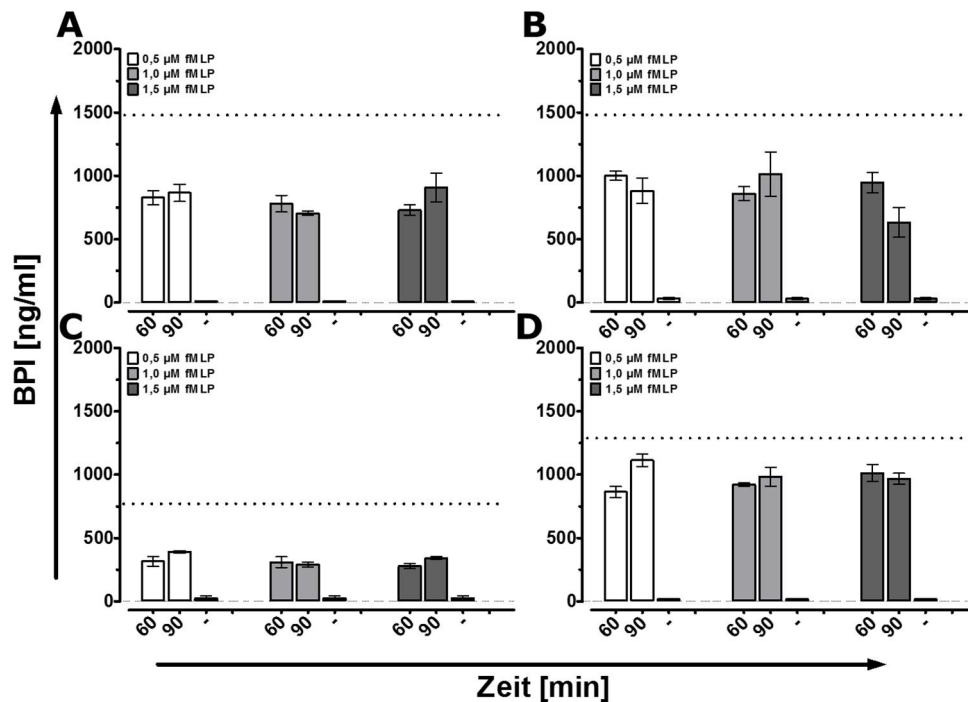
Zur detaillierten Untersuchung wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Hierfür wurden das Blut intrazellulär auf humanes BPI gefärbt. Als Vergleich dienten wiederum Proben von Wildtyp-Mäusen und zusätzlich humane Neutrophile. Wie in Abbildung 8 zu erkennen ist, ist in der transgenen Maus humanes BPI in großen Mengen in neutrophilen Granulozyten vorgespeichert nachweisbar. Die BPI-Färbung ist der bei humanen Neutrophilen sehr ähnlich, während bei den Wildtyp-Mäusen erwartungsgemäß keinerlei humanes BPI Signal nachweisbar ist.

### 3.1.4 Freisetzung von BPI aus neutrophilen Granulozyten

Eine wichtige Voraussetzung für die extrazelluläre Wirkung von BPI ist dessen Freisetzung aus den Granula neutrophiler Granulozyten. Um den Mechanismus der Freisetzung näher untersuchen und zudem die transgenen Maus weiterführend beschreiben zu können, sollte untersucht werden, welche Stimulationen *in vitro* zur Freisetzung von humanem BPI aus transgenen murinen Granulozyten führen und ob die Sekretionseffektivität der von humanen Granulozyten gleicht. Hierfür wurde eine kombinierte Stimulation aus Cytochalasin B und Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine (fMLP) verwendet. Die Versuche wurden mit Vollblut durchgeführt, um die Granulozyten nicht bereits durch mechanische Belastungen der Zellaufreinigung zur Degranulation zu stimulieren. Cytochalasin B (Cyt. B) wurde zur Vorstimulation eingesetzt, da es durch Zytoskelettumstrukturierungen zu einer erhöhten Expression von Oberflächenrezeptoren, wie Formyl-Peptid-Rezeptoren (FPRs), führt. Dies sollte die Effektivität der anschließenden

### 3. Ergebnisse

Stimulation mit fMLP verbessern. Zur Optimierung der Freisetzung wurden verschiedenen Zeitpunkte und Konzentrationen getestet. Zur Charakterisierung der optimalen Stimulationsbedingungen wurden menschliche Granulozyten eingesetzt.

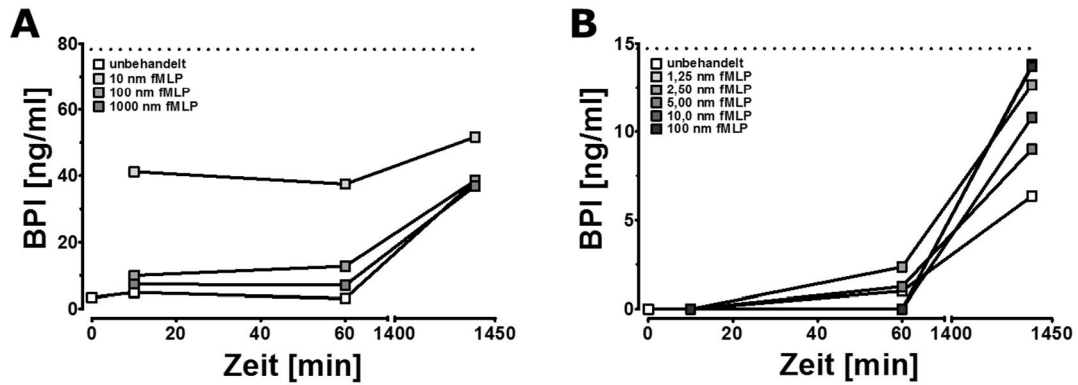


**Abbildung 9: In vitro Freisetzung von BPI-Protein aus humanen neutrophilen Granulozyten im Vollblut.**

Der Gesamtgehalt an BPI wurde durch die Einfrier/Auftau-Methode bestimmt (gepunktete Linie). Die Vorstimulation mit 5 µg/ml Cyt. B erfolgte für 5 min, bei 37 °C. Die Stimulation mit fMLP erfolgte in den angegebenen Konzentrationen bei 37 °C. Unbehandelte Proben wurden zur Kontrolle mitgeführt. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Proben abzentrifugiert (300 x g, 8 min, 4 °C), der Überstand (ÜS) abgenommen, in flüssigem Stickstoff (N<sub>2</sub>) eingefroren und bis zur Messung im Luminex-System bei -70 °C gelagert.

Bei gleichen Stimulationsbedingungen unterschieden sich sowohl Gesamtgehalt als auch maximal freizusetzende Menge an BPI zwischen den einzelnen Spendern. Es zeigte sich, dass eine Stimulation mit 0,5 µM bis 1,5 µM fMLP für 60 bis 90 Minuten (L), zur maximalen BPI-Freisetzung führt. Diese Stimuli sollten auf Mausgranulozyten übertragen und getestet werden. Hierbei zeigte sich jedoch, dass Stimulationsbedingungen, die im humanen System zu einer Freisetzungsrate von bis 90 % führten, nicht auf das Maussystem übertragbar waren (Daten nicht gezeigt).

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 10: In vitro Freisetzung von BPI-Protein aus murinen neutrophilen Granulozyten.**

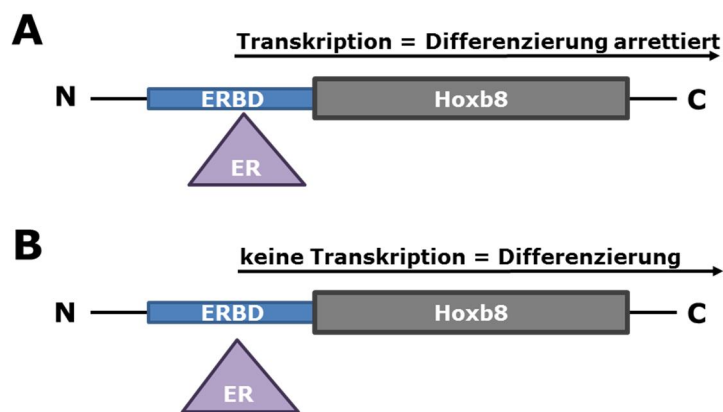
Der Gesamtgehalt an BPI wurde durch die Eifrier-Auftau-Methode bestimmt (gepunktete Linie). Die Vorstimulation mit 5  $\mu\text{g/ml}$  Cyt. B erfolgte für 5 min bei 37 °C. Die Stimulation mit fMLP erfolgte in den angegebenen Konzentrationen, bei 37 °C. Unbehandelte Proben wurden zur Kontrolle mitgeführt. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Proben abzentrifugiert (300 x g, 8 min, 4 °C), der Überstand (ÜS) abgenommen, in flüssigem Stickstoff ( $\text{N}_2$ ) eingefroren und bis zur Messung im Luminex-System bei -70 °C gelagert.

Erste Tests an murinen Granulozyten zeigten, dass insgesamt eine deutlich geringere Gesamtmenge an BPI-Protein vorhanden ist. Zudem scheinen andere Konzentrationen sowie Zeitpunkte nötig zu sein, um eine optimale Freisetzung im murinen System zu erzielen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.2 Untersuchung der BPI-Expressionsregulation an immortalisierten Knochenmarksstammzelllinien

Um detaillierte Untersuchung der BPI-Expressionsregulation durchführen zu können, wurden im Verlauf dieser Arbeit ER-Hoxb8-immortalisierte Stammzelllinien, nach dem Protokoll von Wang et al. 2006, generiert. Hierbei wird das Hoxb8-Fusions-Gen durch retrovirale Transduktion und anschließende Transfektion in primäre Knochenmarkszellen eingebracht. Die Expression von Hoxb8 führt zur Arretierung der Differenzierung von Stammzellen und myeloiden Vorläuferzellen. Zur Regulierung der Expression wurde der N-Terminus des Hoxb8-Gens mit der Bindedomäne des Östrogen-Rezeptors (ER) fusioniert. Die Zugabe von Östrogen führt in diesem System zu einer stetigen Transkription des Hoxb8-Gens,, was zum Stopp der Zelldifferenzierung führt.



**Abbildung 11: Schematische Darstellung des Hoxb8-Fusionsproteins.**

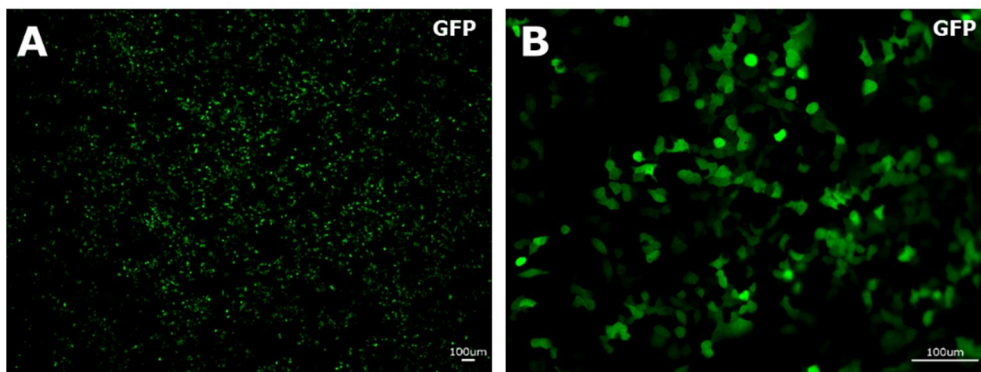
Der N-Terminus des Hoxb8-Gens wurde mit der Bindedomäne (BD) des Östrogen-Rezeptors (ER) fusioniert. Die Bindung von Östrogen (ER) führt zur Transkription von Hoxb8 und somit zum Arretierung der Zelldifferenzierung (A). Ist kein Östrogen vorhanden, erfolgt keine Transkription des Hoxb8-Gens. Dies führt zur Differenzierung der Zellen<sup>1</sup> (B).

Unter Anwesenheit des Wachstumsfaktors SCF (*stem cell factor*) kommt es somit zu einer dauerhaften Proliferation der Zellen. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, stets eine große Menge an pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen zur Verfügung zu haben. Des Weiteren kann durch Östrogen-Entzug und Zugabe bestimmter Wachstumsfaktor die Differenzierung in ausgereifte Zellen des myeloiden Systems erreicht werden. Somit bietet das ER-Hoxb8-System aufgrund der einfachen Regulierung ein geeignetes Modell zur genetischen Analyse kurzlebiger Immunzellen dar und ermöglicht den Verzicht auf langwierige, kostenintensive und ethisch schwer zu rechtfertigende Tierversuche.

### 3. Ergebnisse

#### 3.2.1 Generierung von ER-Hoxb8 immortalisierten Stammzelllinien

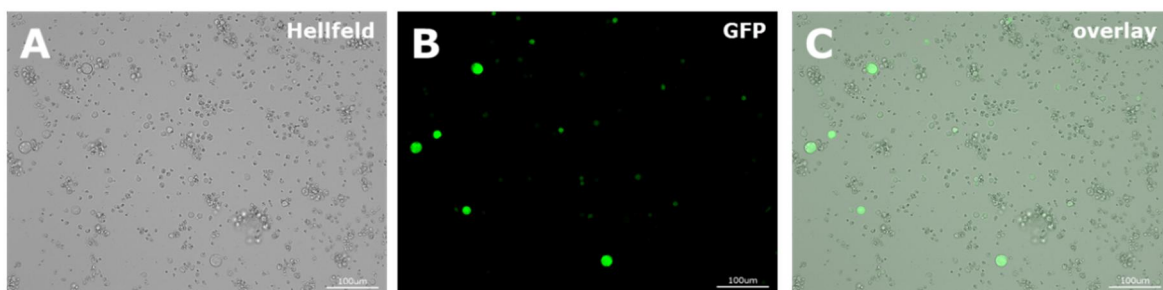
Für die Untersuchung der BPI-Expressionsregulation wurden verschiedene immortalisierte Stammzelllinien generiert. Um Einblicke in die Expression von murinem BPI zu erlangen, welches erst nach Stimulation in neutrophilen Granulozyten gebildet wird, wurden Zelllinien von C57BL/6J-, C57BL/6N- und BPI KO-Mäusen angelegt. In einem ersten Schritt wurden Phoenix-Zellen wie unter Punkt beschrieben mit dem ER-Hoxb8-Konstrukt transfiziert. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurden Ansätze mit einem GFP (*green fluorescent protein*)-Plasmid mitgeführt. Wie in Abbildung 12 zu erkennen ist, verlief die Transfektion mit dem GFP-Plasmid erfolgreich und es konnte von einer Aufnahme des ER-Hoxb8-Konstrukts in das Genom ausgegangen werden.



**Abbildung 12: Mit der Calcium-Phosphat-Transfektion konnte eine hohe Transfektionseffizienz erreicht werden.**

Phoenix-Zellen wurden mit einem GFP-Plasmid transfiziert. Die Aufnahmen erfolgten 24 Stunden nach Transfektion an einem Fluoreszenzmikroskop mit 20-facher (A) und 40-facher (B) Vergrößerung.

Mittels retroviraler Transduktion wurde der Hoxb8-Vektor in die Knochenmarksstammzellen integriert. Die zuvor generierten GFP-Konstrukte dienten auch hier zur Kontrolle der Effizienz. Abbildung 13 zeigt die erfolgreiche Transduktion der Knochenmarkszellen mit dem GFP-Konstrukt. Davon ausgehend wurde auf eine ebenso erfolgreiche Transduktion mit dem ER-Hoxb8-Konstrukt geschlossen.

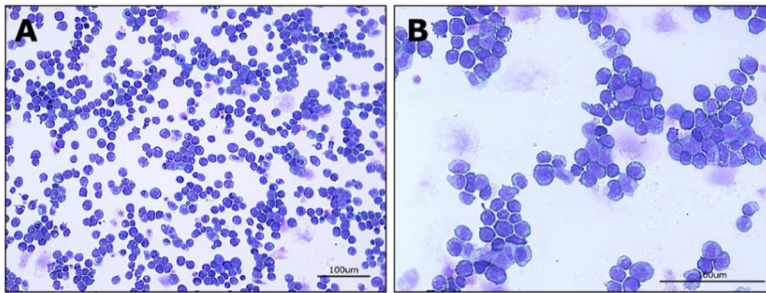


**Abbildung 13: Erfolgreiche retrovirale Transduktion von Knochenmarkszellen.**

Knochenmarkszellen wurden mit einem GFP-Überstand der Phoenix-Zellen transduziert. Dargestellt ist die Transduktion von Knochenmarkszellen der Mauslinien C57BL/6J (A)- und BPI-BAC (B).

### 3. Ergebnisse

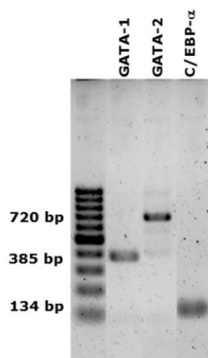
Die verschiedenen Zelllinien wurden kultiviert und sollten nach einem Zeitraum von etwa 21 Tagen den Status von reinen immortalisierten Knochenmarksstammzellen erreicht haben. Um dies zu überprüfen, wurden folgende Untersuchungen vorgenommen. Im ersten Schritt wurden die Zellen optisch beurteilt. Hierfür wurden Zellproben durch Zytozentrifugation auf Objektträger aufgebracht und mittels DiffQuik gefärbt. In Abbildung 14 ist deutlich zu erkennen, dass es sich um monomorphe runde Zellen mit großen, dunkel gefärbten Zellkernen handelt.



**Abbildung 14: ER-Hoxb8-immortalisierte Stammzellen nach DiffQuik-Färbung.**

Stichprobenartige Färbungen, aus verschiedenen Zelllinien, zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Zellen wurden mittels DiffQuik gefärbt und lichtmikroskopisch mit 20- und 40-facher Vergrößerung dokumentiert.

Anschließend sollte die Expression ausgewählter Gene in den generierten Zelllinien auf mRNA-Ebene untersucht werden. Im Verlauf der Differenzierung von myeloiden Vorläuferzellen zeigt sich ein bestimmtes Muster an Transkriptionsfaktoren. Zur Untersuchung, in welchem Stadium sich die einzelnen Stammzelllinien befanden, wurden die Gene GATA-1, GATA-2 und C/EBP $\alpha$  ausgewählt. Mit spezifischen Primern wurde die Expression der drei Gene mittels PCR überprüft. Aus Abbildung 15 geht hervor, dass sich die generierten immortalisierten Knochenmarksstammzelllinien im gewünschten Stadium von hämatopoetischen Stammzellen (GATA-1,  $\pm$ ; GATA-2, ++; C/EBP $\alpha$ ,  $\pm$ ) befanden.



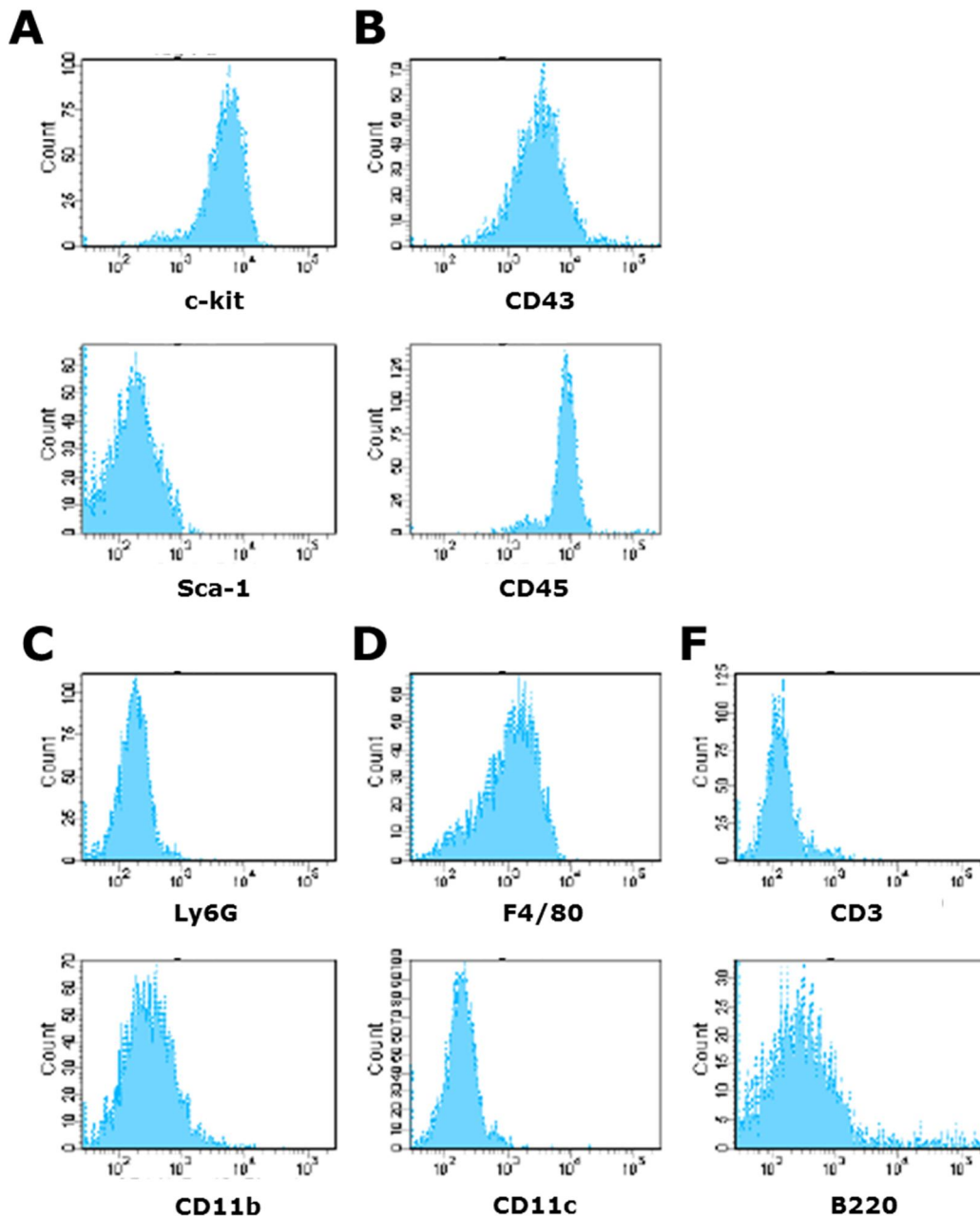
**Abbildung 15: Bei den generierten ER-Hoxb8-Linien handelt es sich um immortalisierte hämatopoetische Stammzellen.**

Gesamt-RNA aus den generierten Zellen wurde extrahiert und revers in cDNA transkribiert. Anschließend wurde die Zielgen-Induktion mit spezifischen Primern mittels PCR-Amplifikation nachgewiesen und auf einem Agarose-Gel dargestellt. Zur Überprüfung der PCR wurde zusätzlich eine PCR für das housekeeping-Gen HPRT durchgeführt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von mehreren durchgeführten Ansätzen.



### 3. Ergebnisse

Weiterführend wurden die generierten Stammzelllinien durchflusszytometrisch, auf die Expression typischer Oberflächenmarker untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit verschiedenen Markern für myeloide Zellen gefärbt. In Abbildung 16 ist zu erkennen, dass die getesteten Zellen alle charakteristischen Oberflächenproteine von hämatopoetischen Stammzellen besaßen, während noch keinerlei spezifische Proteine nachzuweisen waren, die auf eine Differenzierung, hin zu einer definierten Zellpopulation, schließen ließen.



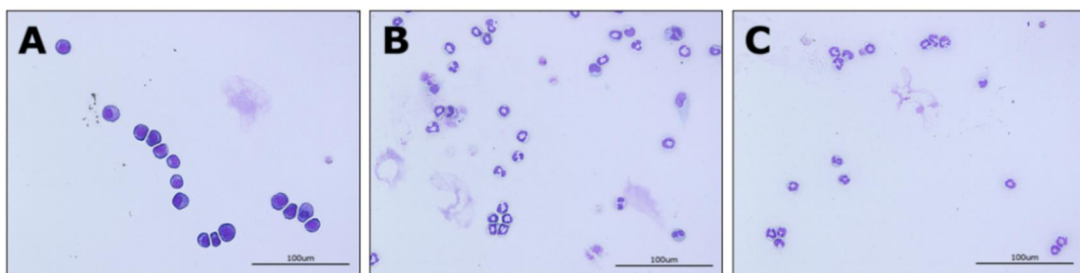
**Abbildung 16: Die generierten Zelllinien konnten durchflusszytometrisch als hämatopoetische Stammzellen identifiziert werden.**

ER-Hoxb8-Zellen wurden mit Antikörpern gegen spezifische Oberflächenproteine gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Exemplarisch dargestellt ist eine durchflusszytometrische Analyse von C57BL/6J-ER-Hoxb8-Zellen. Die analysierten Zellen sind positiv für Stammzellgene (A) und Marker myeloider Linien (B). Die Zellen sind negativ für die Marker von Granulozyten (C), Makrophagen (D), sowie T- und B-Zellen (F).

### 3. Ergebnisse

#### 3.2.2 Differenzierung von ER-Hoxb8 Stammzellen zu neutrophilen Granulozyten

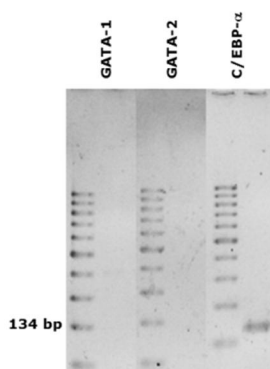
Für die Differenzierung von ER-Hoxb8-Stammzellen zu neutrophilen Granulozyten wurden zwei verschiedenen Protokolle getestet. Zum einen sollten die Differenzierung durch den alleinigen Entzug von Estradiol eingeleitet werden und zum anderen sollte die Entwicklung hin zu neutrophilen Granulozyten zusätzlich durch die Zugaben von G-CSF (*Granulocyte-colony Stimulating Factor*) induziert werden. Beide Stimulation erfolgten über einen Zeitraum von 7 Tagen. Die Zellen wurden täglich auf ihre Morphologie (DiffQuik), Genexpression (PCR) und Oberflächenproteine (Durchflusszytometrie) untersucht. Die beiden Methoden verliefen ähnlich, es zeigte sich jedoch eine geringfügig bessere Differenzierung bei der zusätzlichen Gabe von G-CSF. Im Folgenden werden daher nur die Ergebnisse nach G-CSF-Zugabe näher beschrieben.



**Abbildung 17: Morphologische Dokumentation der Differenzierung von ER-Hoxb8-Stammzellen zu neutrophilen Granulozyten.**

Exemplarisch dargestellt an Zellen der Linie C57BL/6. Im Verlauf der Differenzierung durch Estradiol-Entzug und zeitgleiche Stimulation mit G-CSF verändert sich die Struktur der Stammzellen (A), über stabkernige junge Granulozyten (B), bis hin zu segmentkernigen reifen neutrophilen Granulozyten (C).

In Abbildung 17 ist die Entwicklung von neutrophilen Granulozyten morphologisch dargestellt. Anhand der DiffQuik Analysen konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den entstandenen Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit um neutrophile Granulozyten handelt.



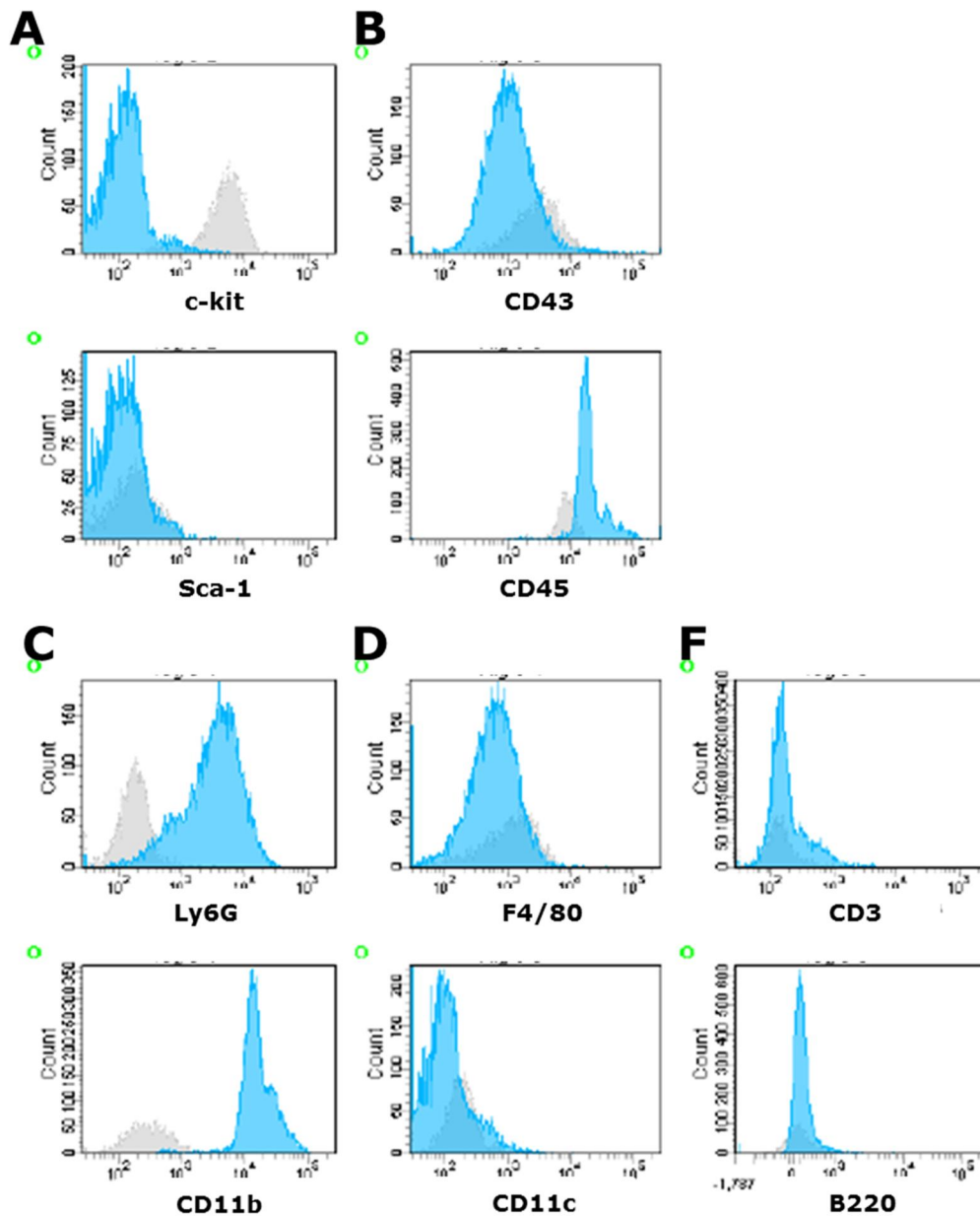
**Abbildung 18: Nachweis der Differenzierung zu ER-Hoxb8-Neutrophilen nach G-CSF-Zugabe.**

Gesamt-RNA aus den generierten Zellen wurde extrahiert und revers in cDNA transkribiert. Anschließend wurde die Zielgen-Induktion mit spezifischen Primern mittels PCR-Amplifikation nachgewiesen und auf einem Agarose-Gel dargestellt. Zur Überprüfung der PCR wurde zusätzlich eine PCR für das housekeeping-Gen HPRT durchgeführt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von mehreren durchgeführten Ansätzen.



### 3. Ergebnisse

Dies sollte anhand von mRNA-Analysen weiter gesichert werden. Hierfür wurde wiederum mit spezifischen Primern die Expression der Stammzellgene GATA-1, GATA-2 und C/EBP $\alpha$  untersucht. Mit zunehmender Zelldifferenzierung sollten die Marker GATA-1 und GATA-2 nicht mehr nachweisbar sein. Nachdem auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden konnte, dass es sich bei den Zellen nicht mehr um Stammzellen handelt (Abb. 18), sollten in einem letzten Schritt die Oberflächenmarker von neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden.



**Abbildung 19: Die generierten Zelllinien konnten durchflusszytometrisch als neutrophile Granulozyten identifiziert werden.**

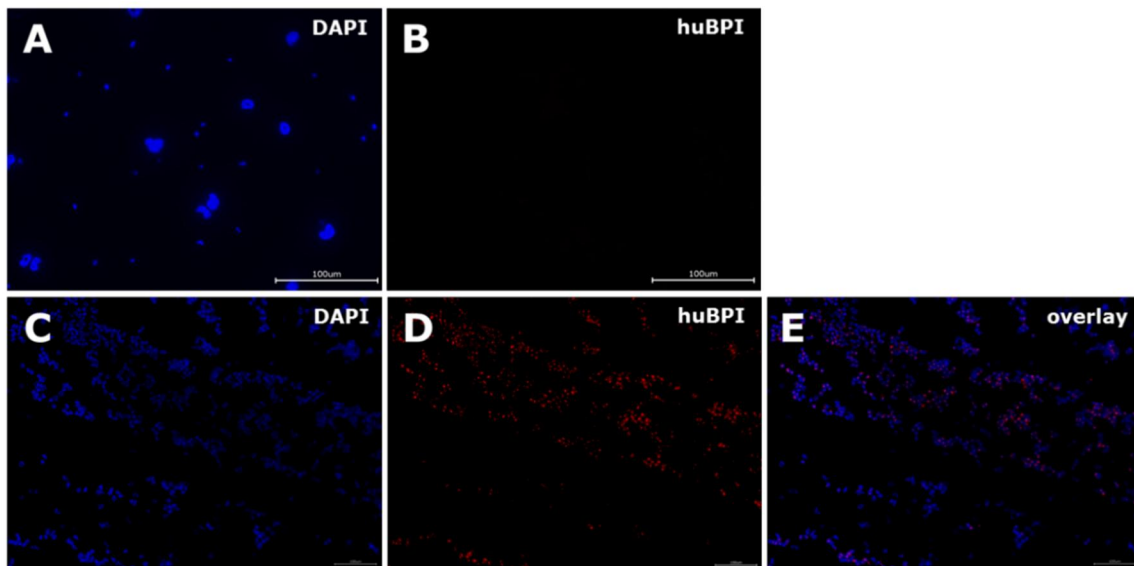
ER-Hoxb8-Zellen wurden im Laufe der Differenzierung mit Antikörpern gegen spezifische Oberflächenproteine gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Exemplarisch dargestellt ist eine durchflusszytometrische Analyse von C57BL/6J-ER-Hoxb8-Zellen. In grau dargestellt ist die Fluoreszenzintensität an Tag 1 (undifferenzierte Stammzellen). Blau dargestellt ist die Fluoreszenzintensität an Tag 6 der Differenzierung mit G-CSF.

### 3. Ergebnisse

In Abbildung 19 ist die exemplarisch eine Differenzierung von C57BL/6J-ER-Hoxb8-Zellen dargestellt. Die Dokumentation erfolgte über 6 Tage. Während dieser Zeit differenzierten die Stammzellen ( $c\text{-kit}^+$ ,  $\text{Sca-1}^+$ ,  $\text{CD43}^{\text{high}}$ ,  $\text{CD45}^{\text{high}}$ ,  $\text{Ly6G}^-$ ,  $\text{CD11b}^-$ ,  $\text{F4/80}^{\text{low}}$ ,  $\text{CD11c}^-$ ,  $\text{CD3}^{\text{low}}$ ,  $\text{B220}^{\text{low}}$ ) zu neutrophilen Granulozyten ( $c\text{-kit}^-$ ,  $\text{Sca-1}^-$ ,  $\text{CD43}^+$ ,  $\text{CD45}^{\text{high}}$ ,  $\text{Ly6G}^{\text{high}}$ ,  $\text{CD11b}^{\text{high}}$ ,  $\text{F4/80}^-$ ,  $\text{CD11c}^{\text{low}}$ ,  $\text{CD3}^{\text{low}}$ ,  $\text{B220}^{\text{low}}$ ). Durch die Wahl der Marker konnte eine Differenzierung hin zu einer anderen Zellpopulation, wie beispielsweise Makrophagen ( $\text{F4/80}^{\text{high}}$ ,  $\text{CD11c}^{\text{high}}$ ) ausgeschlossen werden.

#### 3.2.3 Untersuchung der BPI-Expression in Hoxb8-Neutrophilen

Eines der Ziele, der Herstellung von ER-Hoxb8-Stammzellen, bzw. -Neutrophilen war es, genauere Einblicke in die Expression und Regulation von humanem BPI zu erhalten. Es sollte anhand der generierten Zelllinie, der für BPI und LBP humanisierten Maus, möglich sein, die Expression im zeitlichen Verlauf der Differenzierung von neutrophilen Granulozyten nachzuweisen. Zudem sollte die Freisetzung von BPI aus den Granulozyten näher untersucht werden. In den vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich die Differenzierung mit Estradiol-Entzug und gleichzeitiger Stimulation mit G-CSF am Besten eignet um neutrophile Granulozyten zu generieren. Mit dieser Methoden konnte an Tag 5, anhand unterschiedlichster Methoden, reife neutrophile Granulozyten nachgewiesen werden. Demzufolge wurden Zellen der Linie BPI-LBP-BAC für 5 Tage differenziert und in einem ersten Schritt floureszenzmikroskopisch auf die Expression von humanem BPI hin untersucht.

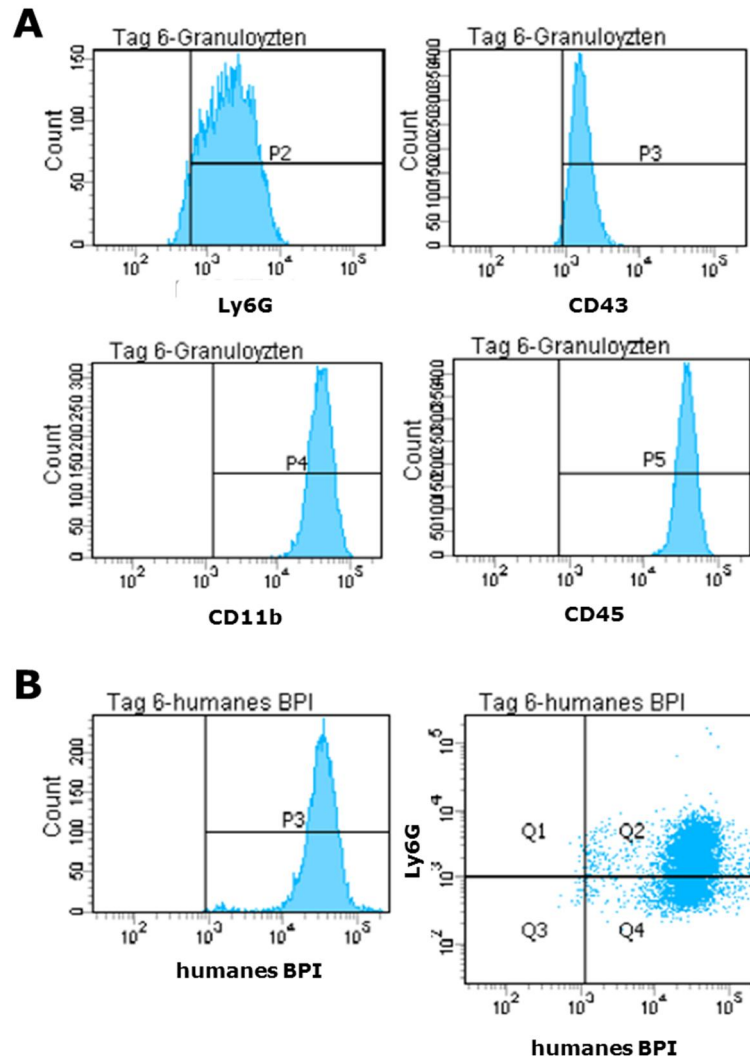


**Abbildung 20: Immunfluoreszenz von humanem BPI in ER-Hoxb8-Neutrophile der BPI-LBP-BAC-Linie.**

ER-Hob8-Neutrophile der für BPI und LBP humanisierten Mauslinie verhalten sich wie humane Granulozyten und sind in der Lage, humanes BPI in ihren Granula zu speichern. Dargestellt ist ein repräsentative Ergebnis. Undifferenzierte Stammzellen (A, B) und für 5 Tage unter Estradiol-Entzug und Gabe von G-CSF differenzierte Neutrophile (C, D, E) wurden mittels Zytocentrifugation auf Objektträger aufgebracht und anschließend gefärbt. Blau, DAPI (4', 6-Diamidin-2-phenylindol) gefärbte Zellkerne; rot, fluoreszenzmarkiertes humanes BPI.

### 3. Ergebnisse

Aus Abbildung 20 ist zu erkennen, dass undifferenzierte Stammzellen noch kein humanes BPI exprimieren. Im Stadium von reifen neutrophilen Granulozyten sind die Zellen jedoch dazu in der Lage und speichern humanes BPI in ihren Granula. Zur genaueren Untersuchung wurden die Zellen zusätzlich durchflusszytometrisch untersucht. Die Zellen wurden auf typische Oberflächenproteine von Granulozyten und intrazellulär auf humanes BPI gefärbt.



**Abbildung 21: Durchflusszytometrische Analyse von ER-Hoxb8-Neutrophile der BPI-LBP-BAC Linie.**

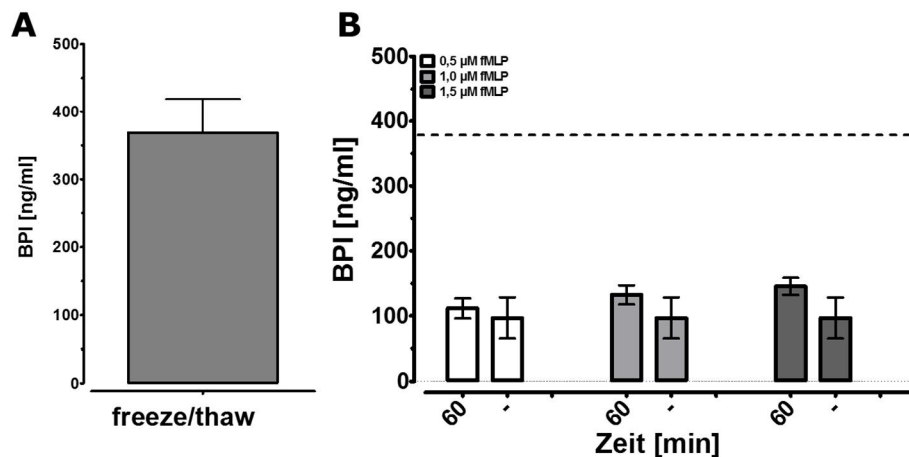
ER-Hoxb8-Zellen wurden nach Differenzierung mit Antikörpern gegen spezifische Oberflächenproteine neutrophiler Granulozyten (A) und intrazelluläres für humanes BPI (B) gefärbt. Die Zellen wurden am Durchflusszytometer analysiert.

Im Durchflusszytometer konnte bestätigt werden, dass es sich bei dem entstandenen Zelltyp um neutrophile Granulozyten handelt ( $CD43^+$ ,  $CD45^{high}$ ,  $CD11b^{high}$ ,  $Ly6G^+$ ). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass diese Neutrophilen in der Lage sind humanes BPI zu synthetisieren und zu speichern. Anhand der durchgeführten Analysen konnte bestätigt werden, dass anhand der Hoxb8-Methode neutrophile Granulozyten in großen Mengen produziert werden können und diese die Fähigkeit besitzen, humanes BPI zu exprimieren.

### 3. Ergebnisse

#### 3.2.4 Stimulation von ER-Hoxb8-Neutrophilen

Die bisher beschriebenen ER-Hoxb8-Neutrophilen der transgenen Mauslinie sollten im weiteren Verlauf der Arbeit für verschiedenste Versuche eingesetzt werden. Um den Prozess der BPI-Freisetzung besser zu verstehen, sollten Hoxb8-Neutrophilen wie in den bereits beschriebenen Vollblut-Assays mit Cytochalasin B und fMLP Stimuliert werden. Hiefür wurden die Stammzellen für 5 Tage mit der G-CSF-Methode differenziert. Für die Experimente wurde eine Zellzahl gewählt, die der Zahl an neutrophilen Granulozyten im Blut entspricht, alle Ansätze wurden analog zum beschriebenen Protokoll durchgeführt.



**Abbildung 22: Stimulation von ER-Hoxb8-Neutrophilen mit Cytochalasin B und fMLP.**

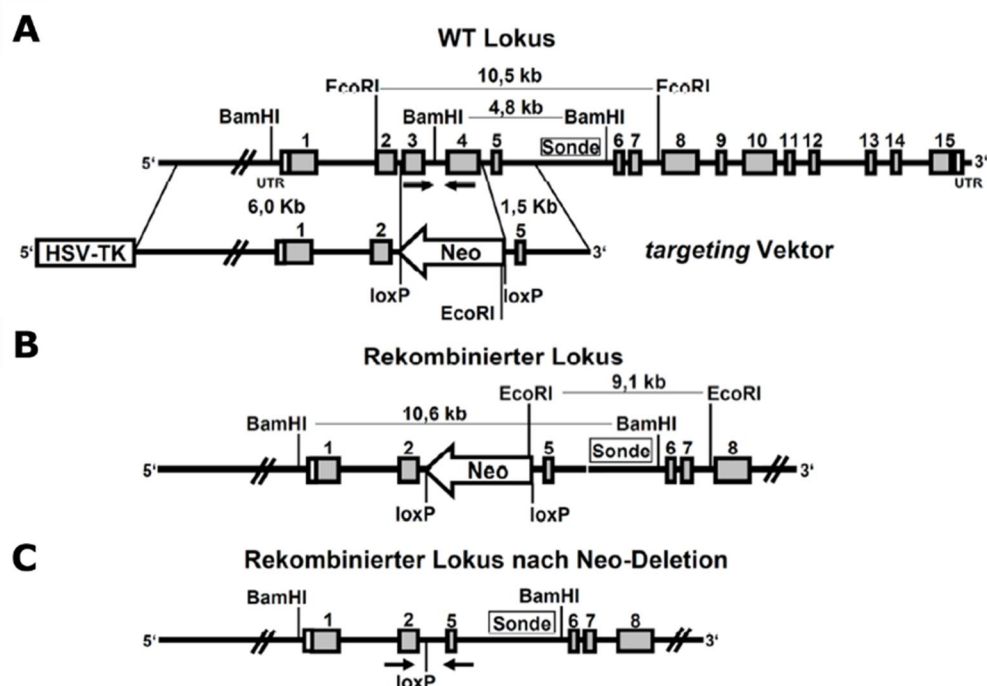
Hoxb8-Stammzellen wurden mit der G-CSF-Methode für 5 Tage differenziert.  $5 \times 10^5$  der entstanden Zellen wurden in die Versuche eingesetzt. Zur Bestimmung des Maximalgehalts an humanem BPI wurde die Einfrier-Auftau-Methode angewandt (A). Es konnte ein Gesamtwert von circa 400 ng/ml BPI festgestellt werden. Die Freisetzung durch Stimualtion mit Cyt.B und fMLP (B) wurde in den angegebenen Konzentrationen für jeweils 60 min durchgeführt. Unstimulierte Proben dienten als Kontrolle. Die Maximalmenge (gepunktete Linie) wurde durch die Einfrier-Auftau Methode bestimmt und lag bei ca. 400 ng/ml. Bereits ohne Stimulation erfolgte eine Freisetzung von knapp 40 % der Gesamtmenge, welche durch Zugabe der Stimulation kaum erhöht werden konnte.

Abbildung 22 zeigt, dass die entstanden Zellen humanes BPI in großer Menge gespeichert hatten. Beim Versuch, die Zellen durch Stimulation zur Degranulation zu führen, traten jedoch Schwierigkeiten auf. Womöglich ist die mechanische Belastung während der Versuchsdurchführung für die Zellen bereits zu groß, sodass ein Teil der Zellen beschädigt oder zur Degranulation angeregt wird, da bereits ohne weiteren Stimulus annähernd 40 % des BPI-Gehalts freigesetzt wurden. Die Stimualtion mit Cytochalasin B und fMLP konnte diesen Wert nur geringfügig erhöhen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.3 Infektion BPI-defizienter und für BPI oder BPI und LBP humanisierter Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren

Die in dieser Arbeit verwendeten Mauslinien wurden alle aus der Barrierehaltung der Zentralen Tierlaboratorien der Universität Regensburg bezogen. Als Kontrolltiere wurden stets Wildtypmäuse der Linie C57BL/6J verwendet. Die verwendeten knockout und transgenen Linien befanden sich ebenfalls auf dem C57BL/6J Hintergrund. Da zu Beginn der Arbeit der Hintergrund der Tiere nicht völlig klar war und die Zahl an Publikationen zu Unterschieden zwischen C57BL/6J und C57BL/6N stetig zunahm, wurde vorab geklärt, welche Rolle der Hintergrund in den angewandten Tiermodellen spielt. Nachdem sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden BL/6-Linien zeigten, wurden die verwendeten knockout und transgenen Linien auf ihren genetischen Hintergrund hin typisiert und falls nötig rückgezüchtet. Für alle Versuche, die in dieser Arbeit dargestellt sind, wurden nur Tiere verwendet, die genetisch eine Reinheit von mehr als 90 % aufwiesen. Alle Linien wurden in regelmäßigen Zeitabständen typisiert um die genetische Identität zu gewährleisten



**Abbildung 23: Targeting-Strategie zur Generierung einer BPI-defizienten Mauslinie.**

Durch spezifisches *gene-targeting* in embryonalen Stammzellen wurde der bakterizide N-terminale Bereich von BPI durch Deletion von Exon 3 und 4 entfernt und durch eine Neo-Kassette ersetzt (A). Graue Boxen kennzeichnen die nummerierten Exons des BPI WT-Lokus, weiße Boxen die untranslatierten Regionen (UTR). Die schwarze Linie bezeichnet Introns und flankierende, nicht kodierende Sequenzen. Der *Targeting* Vektor enthält zur positiven Selektion eine Neomycin Resistenz, flankiert von einem langen 6,0 kb und einem kurzen 1,5 kb Arm zur homologen Rekombination, und zudem eine HSV-Thymidinkinase (TK) zur negativen Selektion der ESZ mit Gangciclovir. (B) Darstellung des Locus nach erfolgreicher homologer Rekombination des *Targeting* Vektors. (C) Der endgültige Locus nach Cre-vermittelter Deletion der Neomycin-Resistenz-Kassette.

### 3. Ergebnisse

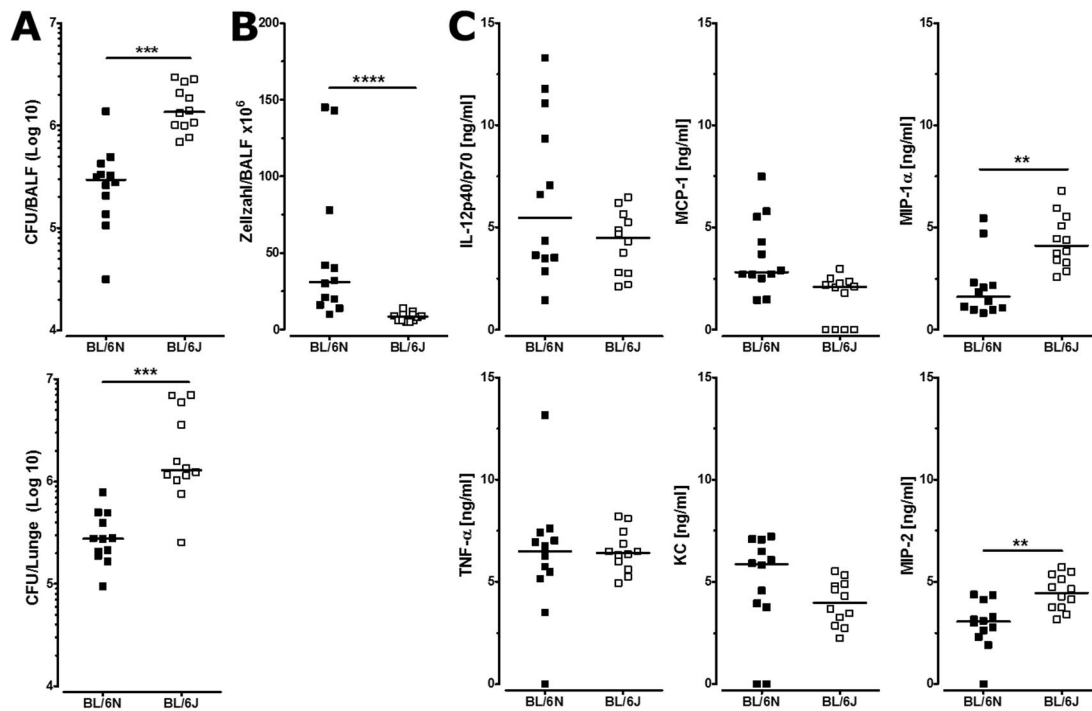
Zur Untersuchung der Rolle von murinem BPI wurde eine BPI-defiziente Mauslinie, im Folgenden als BPI KO bezeichnet, verwendet. Die Linie wurde in der eigenen Arbeitsgruppe generiert. Da die Expression des Ziel-Proteins in nur wenigen definierten Zelltypen auftritt, wurde eine klassische *gene-targeting*-Strategie gewählt. Die Maus wurde bereits in Vorarbeiten charakterisiert und in verschiedenen *in vivo* Modellen eingesetzt.

#### **3.3.1 Der genetische Maushintergrund wirkt sich auf den Verlauf von akuten Lungeninfektionen mit grampositiven und gramnegativen Erregern aus**

Wildtypmäuse der Linien C57BL/6J und C57BL/6N, im weiteren Verlauf als BL/6J und BL/6N bezeichnet, wurden im Modell einer akuten Lungeninfektion mit Gramnegativen und Grampositiven Erregern getestet. Die Auswirkung des genetischen Hintergrunds der beiden BL/6-Linien sollte hinsichtlich des klinischen Verlaufs einer akuten Pneumonie untersucht werden. Hierfür wurde das Maus-Infektionsmodell der akuten Pneumonie etabliert, das sich durch eine starke Infiltration von neutrophilen Granulozyten in die unteren Atemwege auszeichnet. Die Versuchstiere wurden nach einer Isoflurannarkose intratracheal mit Grampositiven oder Gramnegativen Bakterien infiziert. Anschließend wurden die Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten abgetötet, Herzblut zur Serumgewinnung entnommen und eine bronchoalveolären Lavage (BAL) durchgeführt. Zudem wurde Lungengewebe entnommen. Sowohl aus der gewonnenen BAL-Flüssigkeit (BALF) als auch dem Serum sollte die Zytokinproduktion proinflammatorischer Zytokine gemessen werden. Die BALF und ein angefertigtes Lungenhomogenat dienten zur Bestimmung der bakteriellen Last. Hierfür wurden Verdünnungsreihen ausplattiert und die CFUs (*colony forming units*) ausgezählt. Zusätzlich wurde die Zahl infiltrierender Immunzellen aus der BALF bestimmt und Lungengewebe zur histologischen Untersuchung fixiert und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Der Versuchsaufbau war in allen unter diesem Punkt beschriebenen Experimenten wie erläutert. Abweichungen sind beim jeweiligen Experiment aufgeführt.

Um den Verlauf einer Gramnegativen Infektion in den BL/6-Unterstämmen zu untersuchen, wurde mit dem Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* (PSAE) infiziert. Die Tiere wurden nach 6 Stunden abgetötet und einer bronchoalveolären Lavage (BAL) unterzogen, um daraus die Bakterienlast, die Zahl infiltrierender Immunzellen und die Induktion proinflammatorischer Zytokine nachzuweisen. Zusätzlich wurde die Lunge präpariert. Die Hälfte der entnommenen Lunge wurde zur Bestimmung der Bakterienlast aufgeschlossen und ausplattiert. Die andere Hälfte wurde für histologische Untersuchungen fixiert und gefärbt. Im Verlauf der 6 Stunden zeigten beide Gruppen deutliche Krankheitssymptome. Ausgeprägter erschien der klinische Verlauf in den BL/6N-Tieren. Bei der Durchführung der BAL zeigte die erhaltene BALF der BL/6N-Mäuse eine stärkere Rotfärbung. Die Lunge erschien ebenfalls deutlich angegriffener als bei den BL/6J-Mäusen.

### 3. Ergebnisse



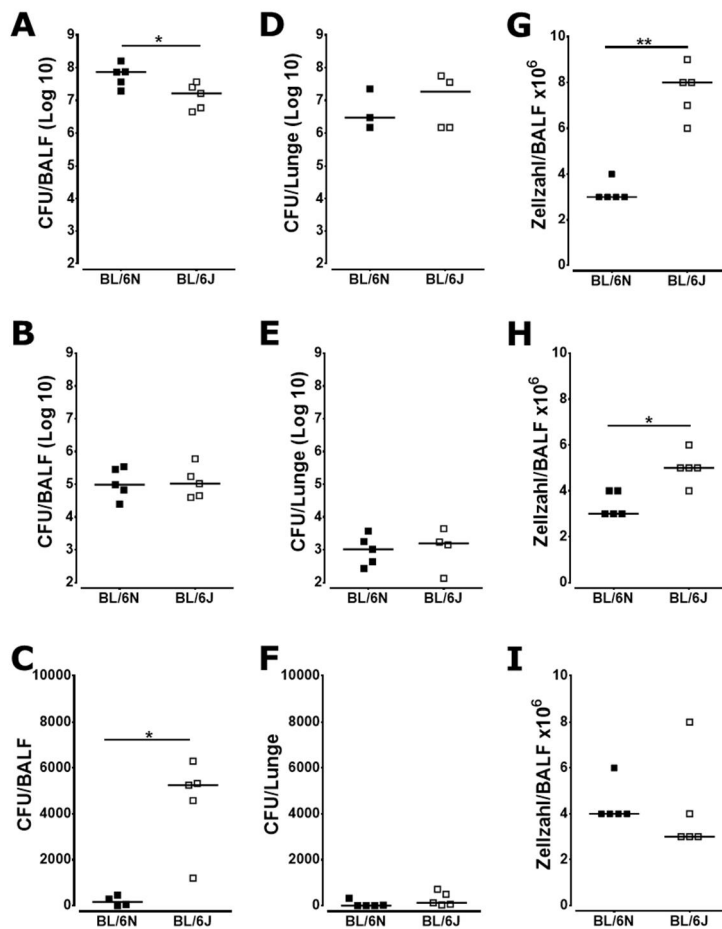
**Abbildung 24: Im Modell der akuten *Pseudomonas aeruginosa* induzierten Lungeninfektion zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden BL/6-Mauslinien.**

Jeweils 6 Männchen, im Alter von 8-12 Wochen wurden nach Isofluran-Narkotisierung intratracheal mit  $3 \times 10^6$  CFU *P. aeruginosa* ATCC 27853 inokuliert. Nach 6 Stunden wurden die Versuchstiere abgetötet und eine BAL durchgeführt und Lungengewebe homogenisiert. Durch Ausplattierung der BALF und des Homogenats, anschließender Anzucht und Auszählung der  $\bar{U}$ N gewachsenen CFU (*colony forming units*) wurde die Bakterienlast in den Lungen der Tiere bestimmt (A). In der BALF wurde die Leukozytenzahl mikroskopisch bestimmt (B). Zytokinkonzentrationen der BALF (C) wurden mittels ELISA analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz der Unterschiede wurde mittels *t*-test nach Kruskal-Wallis (\*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ) berechnet.

Innerhalb der jeweiligen Gruppe konnte keine unterschiedliche bakterielle Last zwischen der BALF und dem Lungengewebe festgestellt werden. Ein signifikanter Unterschied in der Bakterienlast bestand jedoch jeweils zwischen den beiden Gruppen. BL/6J-Mäuse wiesen gegenüber BL/6N-Mäusen eine deutlich höhere Zahl an Bakterien auf. Die Zellzahl eingewanderter Leukozyten in die Lunge korrelierte invers mit der bakteriellen Last. Während BL/6J-Mäuse eine deutlich höhere Bakterienlast aufwiesen, konnte nur eine geringe Zahl infiltrierender Zellen nachgewiesen werden. Bei den BL/6N-Mäusen zeigte sich hingegen bei einer reduzierten bakteriellen Last eine signifikant erhöhte Zahl an Immunzellen in der BAL. Die eingewanderten Zellen wurden hinsichtlich ihres Zelltyps morphologisch durch Zytocentrifugation und anschließende DiffQuik-Färbung charakterisiert. Hierbei konnten keine qualitativen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Bei der Zytokinproduktion zeigten sich nur schwache Unterschiede bei IL-12p40/p70, TNF- $\alpha$ , MCP-1 und KC. Signifikante Unterschiede waren bei den Zytokinen MIP-1 $\alpha$  und MIP-2 zu verzeichnen. Hierbei war die

### 3. Ergebnisse

Produktion in den BL/6J-Gruppen drastisch erhöht. Nach einer Lungeninfektion mit Gramnegativen Erregern zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden BL/6-Mauslinien. Sowohl die Keimlast, als auch die Zahl einwandernder Leukozyten und die daraus resultierende Produktion von inflammatorischen Zytokinen wiesen signifikante Abweichungen auf. Nachfolgend sollte geklärt werden, ob ähnliche Unterschiede auch bei akuten Infektionen mit Grampositiven Erregern auftreten. Hierfür wurde *Streptococcus pneumoniae* (SRPN) verwendet. Für diese Infektionen wurden zusätzlich zu den 6 Stunden die Werte für 24 und 48 Stunden bestimmt. Wie bereits bei der Gramnegativen Infektion, fielen die Tiere des BL/6N-Hintergrundes durch ein schlechteres Allgemeinbefinden auf.



**Abbildung 25: Bei der *Streptococcus pneumoniae* induzierten Lungeninfektion zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden BL/6-Unterstämmen, sowohl bei der Bakterienlast, als auch bei der Zellzahl eingewanderter Leukozyten.**

Jeweils 5 Weibchen, im Alter von 8-12 Wochen wurden nach Isofluran-Narkotisierung intratracheal mit  $5 \times 10^7$  CFU *S. pneumoniae* ATCC 46619 inokuliert. Nach 6 (A, B, C), 24 (D, E, F) und 48 (G, H, I) Stunden wurden die Versuchstiere abgetötet und eine BAL durchgeführt und Lungengewebe homogenisiert. Durch Ausplattierung der BALF (A, D, G) und des Homogenats (B, E, H), anschließender Anzucht und Auszählung der ÜN gewachsenen CFU (*colony forming units*), wurde die Bakterienlast in den Lungen der Tiere bestimmt. In der BALF wurde die Leukozytenzahl mikroskopisch bestimmt (C, F, I). Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM eines repräsentativen Experiments. Die Signifikanz der Unterschiede wurde mittels *t-test nach* Kruskal-Wallis (\*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ) berechnet.



### 3. Ergebnisse

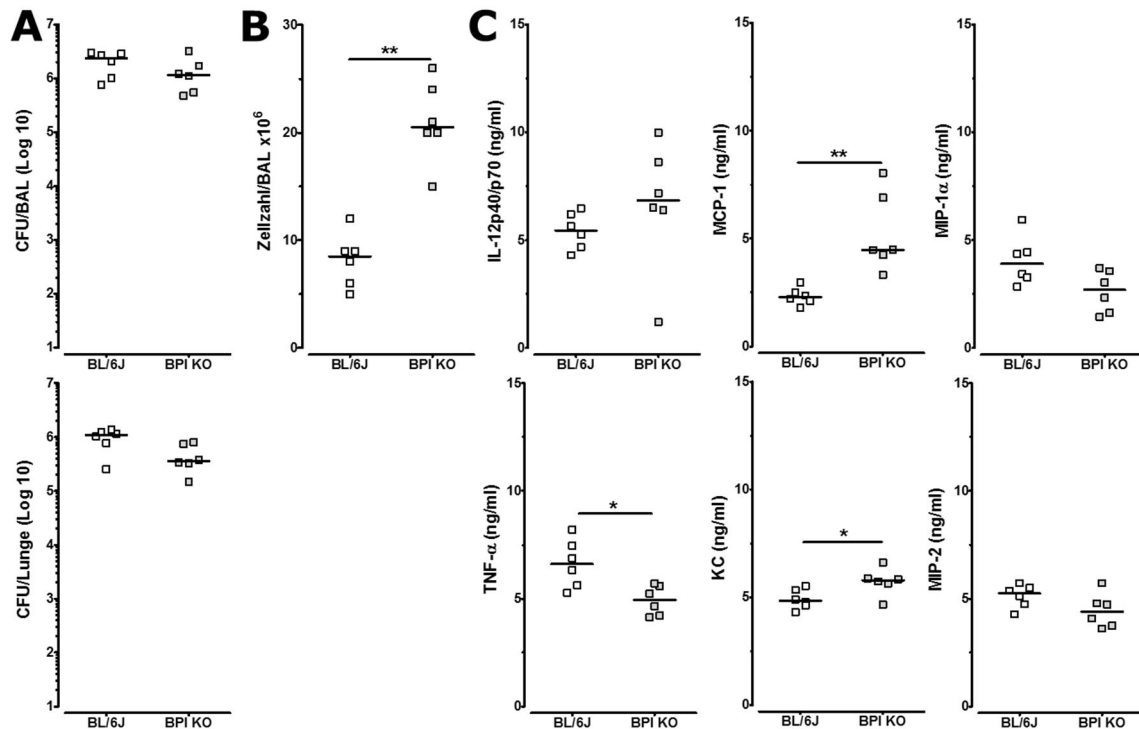
In der BALF zeigte sich bei der BL/6J-Gruppe eine signifikant niedrigere Bakterienlast als bei den BL/6N-Tieren während sich die Bakterienzahl in den Lungengeweben nicht signifikant unterschied. und deutlich geringer als in der BALF war. Wie bereits bei der akuten Pneumonie mit *P. aeruginosa*, zeigt sich auch bei grampositiven Bakterien eine inverse Korrelation der Bakterienlast und Zellzahl. Bei den BL/6J-Mäusen konnten nach 6 Stunden Infektion signifikant mehr Leukozyten in der BALF nachgewiesen werden, als bei den BL/6N-Tieren. Nach 24 Stunden waren keine Unterschiede in der Bakterienlast nachweisbar. Die CFUs der BL/6N-Gruppe waren jedoch um drei Log-Stufen gesunken, in der BL/6J-Gruppe hingegen um nur um zwei. Während sich bei der Bakterienlast keine Unterschiede mehr festzustellen waren, war die Zellzahl in der BALF auch nach 24 Stunden in den BL/6J-Mäusen signifikant erhöht. Nach einer Infektionsdauer von 48 Stunden zeigen sich weiterhin signifikante Unterschiede zwischen den beiden Mausgruppen. Zu diesem Zeitpunkt weisen BL/6J-Tiere eine signifikant höhere bakterielle Last in der BALF auf, während die Zellzahlen nicht mehr unterschiedlich waren. In beiden Gruppen pendelte sich die Zellzahl zu diesem Zeitpunkt bei einem durchschnittlichen Wert von  $3-4 \times 10^6$  Zellen ein. Zusammenfassend zeigte sich ein abweichender Infektionsverlauf zwischen den BL/6-Unterstämmen, nach Infektion mit den grampositiven Bakterien *S. pneumoniae*. Im frühen Verlauf der Infektion (6 Stunden) weisen BL/6J-Mäuse eine geringere bakterielle Last in der BALF auf. Die Bakterien werden jedoch im Vergleich zu BL/6N-Mäusen langsamer eliminiert, wodurch sich die CFUs im mittleren Bereich (24 Stunden) annähern. Zum Ende der Infektion (48 Stunden) verbleibt somit eine signifikant höhere Bakterienzahl in der BALF von BL/6J-Tieren. Die Zellzahl korreliert im frühen und mittleren Verlauf der Infektion invers mit der Bakterienlast, gleicht sich jedoch gegen Ende der Infektion an.

#### **3.3.2 Die Rolle von BPI bei pulmonalen Infektionen und Entzündungsgeschehen**

##### 3.3.2.1 BPI in der akuten *Pseudomonas aeruginosa* induzierten Lungeninfektion

In der ersten Versuchsreihe sollte die Rolle von murinem BPI bei pulmonalen Infektion abgeklärt werden. Hierfür wurde die Infektion an Wildtyp und an BPI-defizienten Mäusen, im Weiteren BPI KO bezeichnet, durchgeführt. Um die Wirkung von BPI in vivo bei der Infektion mit gramnegativen Erregern untersuchen zu können, wurden die Tiere mit einer Dosis von  $3 \times 10^6$  CFU *Pseudomonas aeruginosa* (PSAE) intratracheal infiziert.

### 3. Ergebnisse

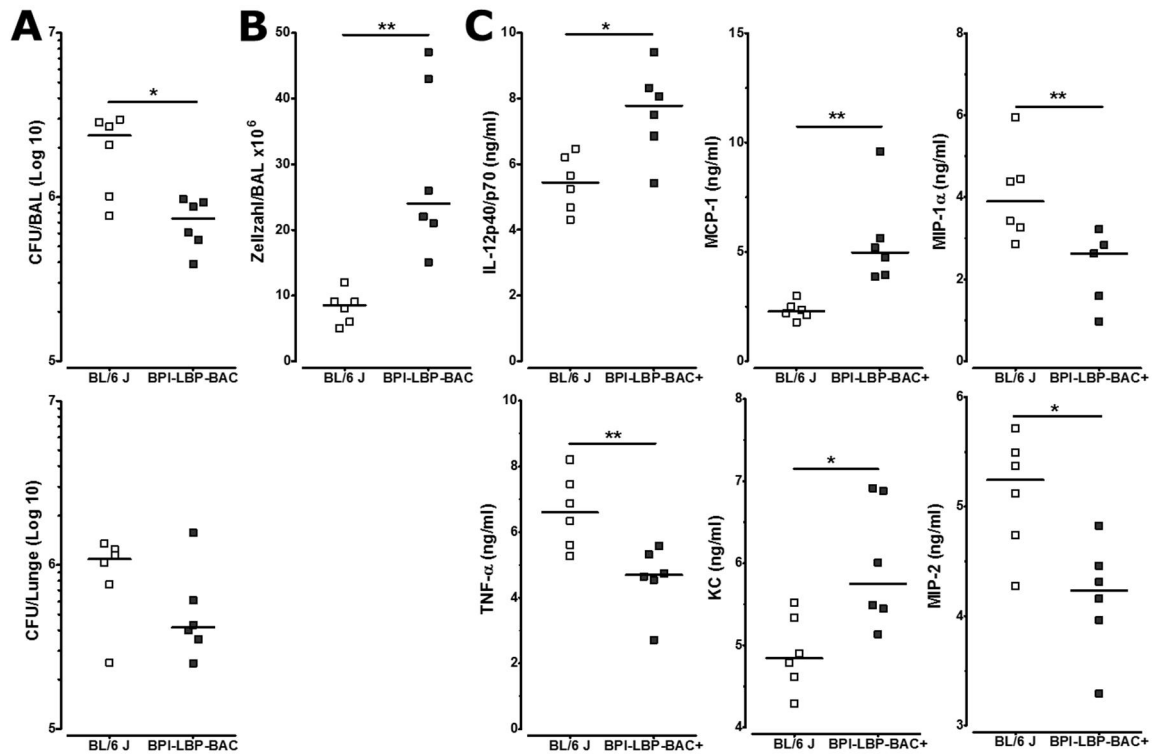


**Abbildung 26: Einfluss von BPI auf die Bakterienelimination und Zellzahl in der BAL nach Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa*.**

Jeweils 6 Männchen, im Alter von 8-12 Wochen wurden nach Isofluran-Narkotisierung intratracheal mit  $3 \times 10^6$  CFU *P. aeruginosa* ATCC 27853 inokuliert. Nach 6 Stunden wurden die Versuchstiere abgetötet und eine BAL durchgeführt und Lungengewebe homogenisiert. Durch Ausplattierung der BALF und des Homogenats, anschließender Anzucht und Auszählung der  $\bar{U}N$  gewachsenen CFU (*colony forming units*) wurde die Bakterienlast in den Lungen der Tiere bestimmt (A). In der BALF wurde die Leukozytenzahl mikroskopisch bestimmt (B). Die Zytokinkonzentrationen in der BALF (C) wurden mittels ELISA analysiert. Dargestellt ist der Median eines repräsentativen Experiments. Die statistischen Auswertung erfolgte nicht-parametrisch mit dem Mann-Whitney Test (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,005$ ).

Murines BPI hatte im ausgewählten Modell der akuten Lungeninfektion mit *P. aeruginosa* keinen Einfluss auf die die Eliminierung des gramnegativen Erregers. Es ließen sich weder in der BALF noch im Lungengewebe Unterschiede in der Keimlast zwischen Kontrolltieren und BPI-defizienten Mäusen feststellen. Das Fehlen von murinem BPI führte jedoch zu einer signifikant erhöhten Zellzahl in der BALF. Zudem wiesen die BPI-defizienten Mäuse im Vergleich zu Wildtypen ein verändertes Zytokinmuster in der BALF auf. Die Zytokine KC und MIP-2, welche Immunzellen anlocken, waren in BPI KO-Tieren signifikant erhöht. Konzentrationen von  $TNF-\alpha$ , einem von Makrophagen sezernierten Zytokin, waren bei Abwesenheit von BPI hingegen signifikant erniedrigt. Im nächsten Schritt wurde die Funktion von humanem BPI in diesem Infektionsmodell untersucht. Hierfür wurden parallel die für BPI und LBP humanisierten Mäuse, im weiteren Verlauf als BPI-LBP-BAC+ bezeichnet, infiziert.

### 3. Ergebnisse



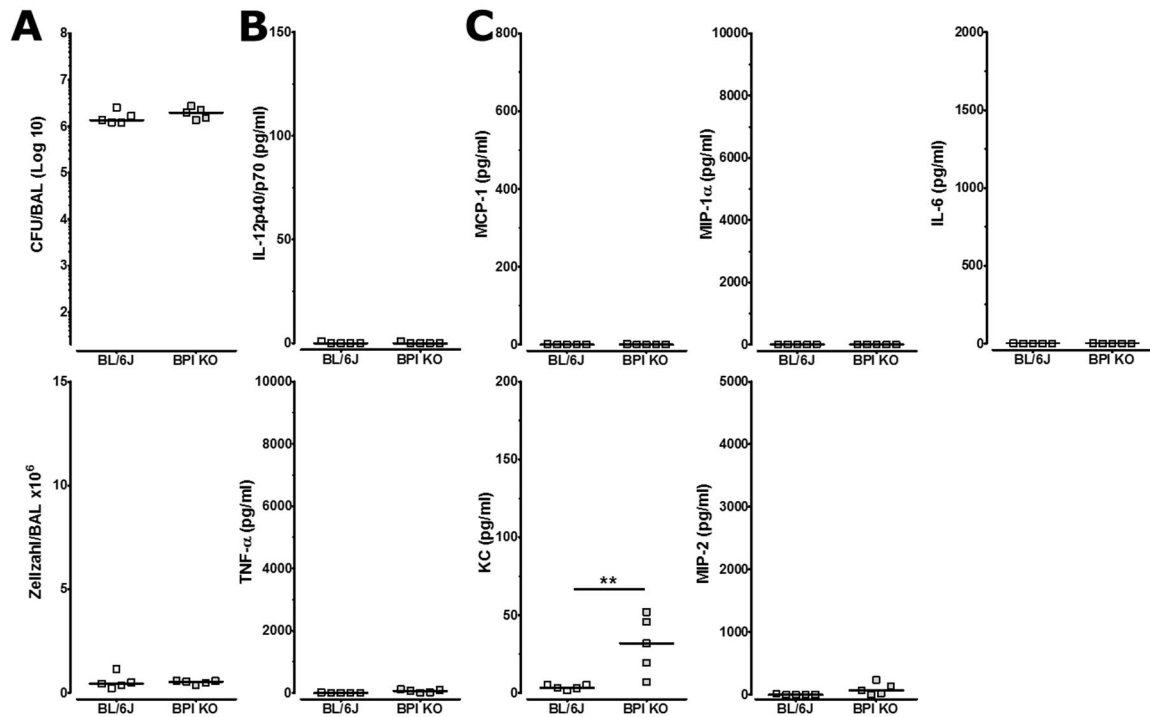
**Abbildung 27: Humanes BPI reduziert die Keimlast effektiver als murines BPI.**

Jeweils 6 Männchen, im Alter von 8-12 Wochen wurden nach Isofluran-Narkotisierung intratracheal mit  $3 \times 10^6$  CFU *P.aeruginosa* ATCC 27853 inokuliert. Nach 6 Stunden wurden die Versuchstiere abgetötet und eine BAL durchgeführt und Lungengewebe homogenisiert. Durch Ausplattierung der BALF und des Homogenats, anschließender Anzucht und Auszählung der ÜN gewachsenen CFU (*colony forming units*) wurde die Bakterienlast in den Lungen der Tiere bestimmt (A). In der BALF wurde die Leukozytenzahl mikroskopisch bestimmt (B). Die Zytokinkonzentrationen in der BALF (C) wurden mittels ELISA analysiert. Dargestellt ist der Median eines repräsentativen Experiments. Die statistischen Auswertung erfolgte nicht-parametrisch mit dem Mann-Whitney Test (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,005$ ).

Das Vorhandensein von humanem BPI wirkte sich signifikant auf die Bakterienlast in der Lunge infizierter Mäuse aus. Diese war in den BPI-LBP-BAC+ Mäusen um fast eine Log-Stufe niedriger als in den Wildtypen. Die erniedrigte Keimlast korreliert wiederum invers mit einer erhöhten Zellzahl infiltrierender Leukozyten. Die Zahl an Leukozyten war in der BALF der transgenen Tiere drastisch erhöht. Die Expression proinflammatorischer Zytokine in der BALF wies ebenfalls deutliche Unterschiede auf. Die nachgewiesene Menge an IL-12, MCP-1 und KC war in transgenen Mäusen signifikant erhöht, während die Werte für MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  und MIP-2 signifikant niedriger waren als in BL/6J-Mäusen.

### 3. Ergebnisse

Im weiteren Verlauf wurde untersucht, inwieweit murines und humanes BPI den Infektionsverlauf von Grampositiven akuten Lungeninfektionen beeinflussen. Hierfür wurden die entsprechenden Gruppen mit einer Dosis von  $3 \times 10^6$  CFU *Streptococcus pneumoniae* (SRPN) intratracheal instilliert. In diesen Experimenten wurden 4 Zeitpunkte ausgewählt. Die erste Gruppe wurde nach 15 min abgetötet, um die erfolgreiche Infektion der Lunge nachzuweisen und den Grundzustand von Zellzahl und Zytokinkonzentrationen zu ermitteln. Weiterhin wurden Tiere nach 6, 24 und 48 Stunden abgetötet, um den zeitlichen Verlauf der Infektion zu dokumentieren.

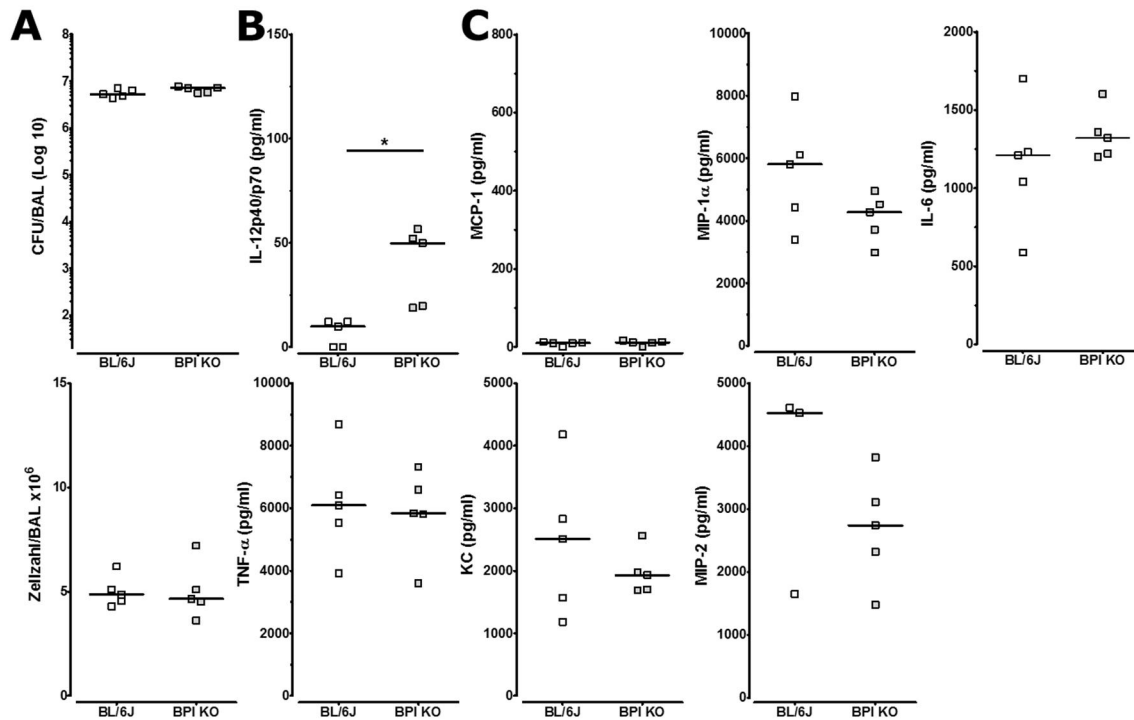


**Abbildung 28: Nachweis der applizierten Bakterien ( $3 \times 10^6$  CFU *S. pneumoniae*) 15 Minuten nach Infektion.**

Jeweils 5 Weibchen, im Alter von 8-12 Wochen wurden nach Isofluran-Narkotisierung intratracheal mit  $3 \times 10^6$  CFU *S. pneumoniae* 9941 inokuliert. 15 min nach Infektion wurden die Versuchstiere abgetötet und eine BAL durchgeführt. Durch Ausplattierung der BALF, anschließender Anzucht und Auszählung der ÜN gewachsenen CFU (*colony forming units*) wurde die Bakterienlast in den Lungen der Tiere bestimmt (A). In der BALF wurde die Leukozytenzahl mikroskopisch bestimmt (B). Die Zytokinkonzentrationen in der BALF (C) wurden im Luminex-System analysiert. Dargestellt ist der Median eines repräsentativen Experiments. Die statistischen Auswertung erfolgte nicht-parametrisch mit dem Mann-Whitney Test (\*\*:  $p < 0,005$ ).

Da *S. pneumoniae* im Gegensatz zu *P. aeruginosa* keine Biofilme produziert wurde in dieser Versuchsreihe die Bakterienlast lediglich in der BALF bestimmt. Die Infektion verlief erfolgreich, die eingestellte Dosis konnte einheitlich in den Lungen aller infizierten Tiere nachgewiesen werden. In der BALF befand sich nur eine geringe Menge an Leukozyten. Die BALF enthielt mit einer Ausnahme keines der gemessenen Zytokine. In den BPI KO-Mäusen war bereits zu Beginn der Infektion KC deutlich erhöht.

### 3. Ergebnisse

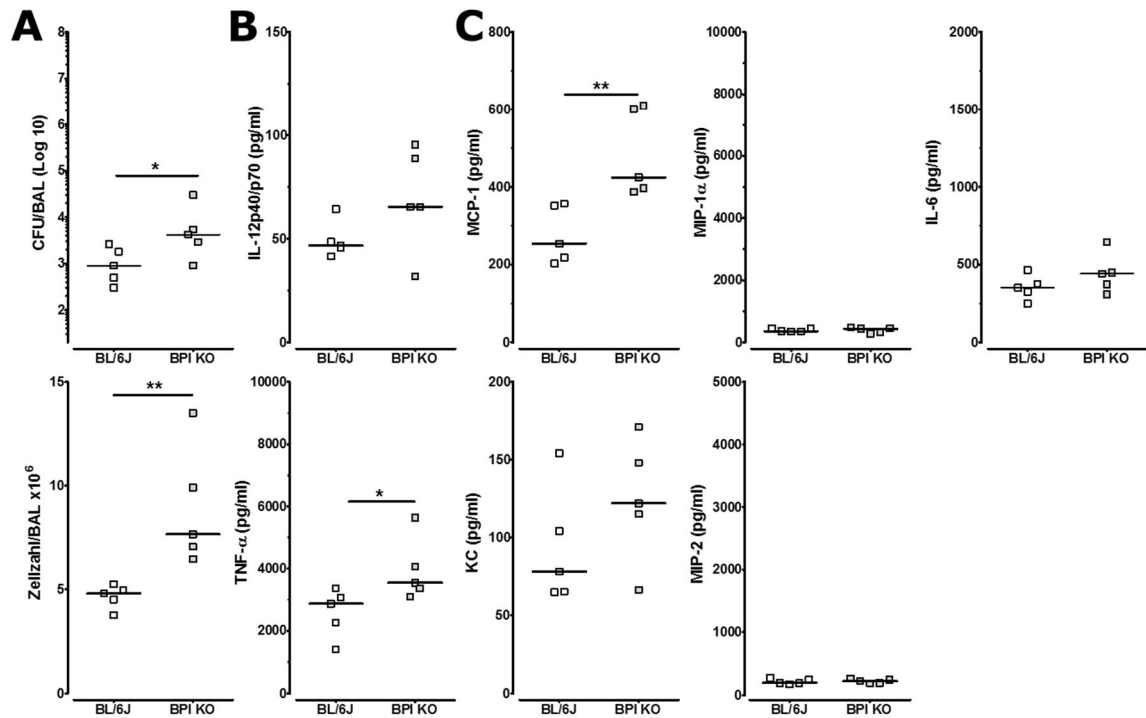


**Abbildung 29: Das Fehlen von murinem BPI führt 6 Stunden nach Infektion zu keinem Nachteil in der Bekämpfung der Bakterien.**

Jeweils 5 Weibchen, im Alter von 8-12 Wochen wurden nach Isofluran-Narkotisierung intratracheal mit  $3 \times 10^6$  CFU *S. pneumoniae* 9941 inokuliert. 6 Stunden nach Infektion wurden die Versuchstiere abgetötet und eine BAL durchgeführt. Durch Ausplattierung der BALF, anschließender Anzucht und Auszählung der ÜN gewachsenen CFU (*colony forming units*) wurde die Bakterienlast in den Lungen der Tiere bestimmt (A). In der BALF wurde die Leukozytenzahl mikroskopisch bestimmt (B). Die Zytokinkonzentrationen in der BALF (C) wurden im Luminex-System analysiert. Dargestellt ist der Median eines repräsentativen Experiments. Die statistischen Auswertung erfolgte nicht-parametrisch mit dem Mann-Whitney Test (\*\*:  $p < 0,005$ ).

Zum frühen Infektionsverlauf, nach 6 Stunden, konnte keine Wirkung von BPI festgestellt werden. Die BPI-defizienten Tiere, waren im Gegensatz zu den Wildtypmäusen nicht im Nachteil. In beiden Gruppen stieg die Bakterienlast innerhalb der 6 Stunden um knapp eine Log-Stufe an. Die Zahl eingewanderter Leukozyten stieg in beiden Gruppen vergleichbar auf circa  $5 \times 10^6$  Zellen an. Die Zytokinsynthese war deutlich angelaufen, wies jedoch keine Genotyp-spezifischen Unterschiede auf.

### 3. Ergebnisse

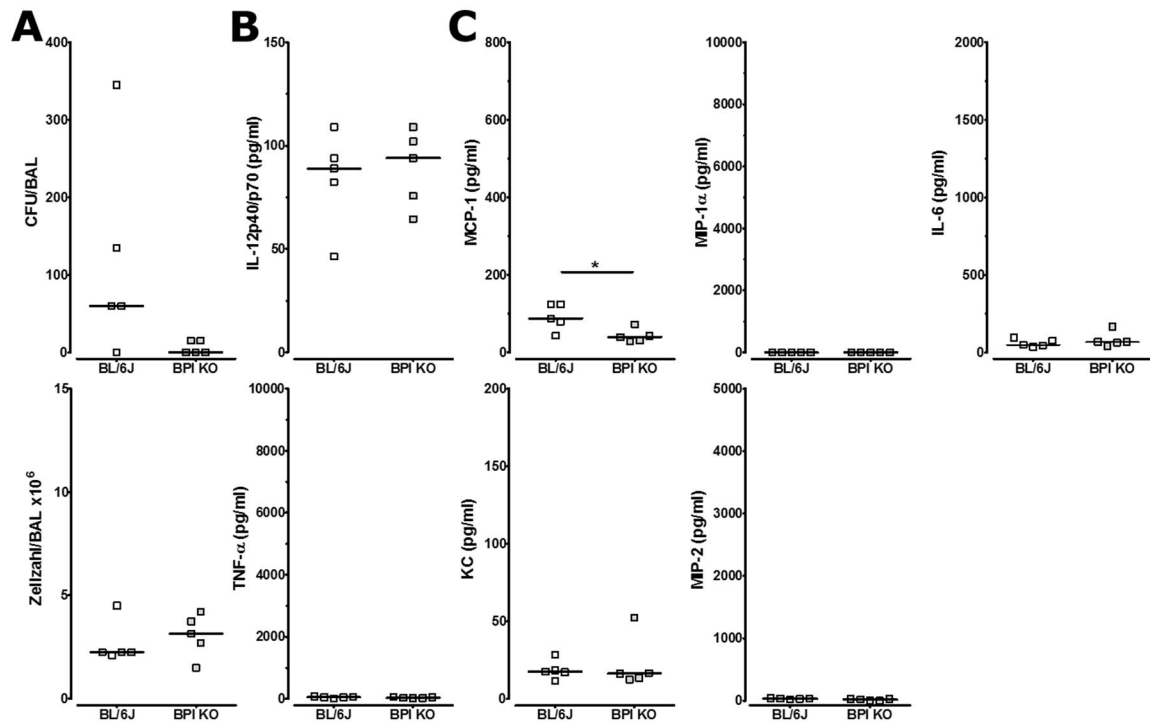


**Abbildung 30: BPI-defiziente Mäuse weisen nach 24 Stunden eine signifikant erhöhte Keimlast, Zellzahl und Zytokinproduktion in der BALF auf.**

Jeweils 5 Weibchen, im Alter von 8-12 Wochen wurden nach Isofluran-Narkotisierung intratracheal mit  $3 \times 10^6$  CFU *S. pneumoniae* 9941 inokuliert. 24 Stunden nach Infektion wurden die Versuchstiere abgetötet und eine BAL durchgeführt. Durch Ausplattierung der BALF, anschließender Anzucht und Auszählung der ÜN gewachsenen CFU (*colony forming units*) wurde die Bakterienlast in den Lungen der Tiere bestimmt (A). In der BALF wurde die Leukozytenzahl mikroskopisch bestimmt (B). Die Zytokinkonzentrationen in der BALF (C) wurden im Luminex-System analysiert. Dargestellt ist der Median eines repräsentativen Experiments. Die statistischen Auswertung erfolgte nicht-parametrisch mit dem Mann-Whitney Test (\*\*:  $p < 0,005$ ).

Im weiteren Verlauf der Infektion zeigte sich eine Rolle des murinen BPI für die Kontrolle einer Infektion mit dem Grampositiven Erreger *S. pneumoniae*. BPI-defiziente Tiere waren trotz erhöhter Anzahl infiltrierter Leukozyten nicht in der Lage die Bakterienlast ebenso effizient zu bekämpfen wie Wildtyp-Mäuse. Die Konzentrationen der Zytokine MCP-1 und TNF-α waren bei Fehlen von BPI deutlich erhöht.

### 3. Ergebnisse



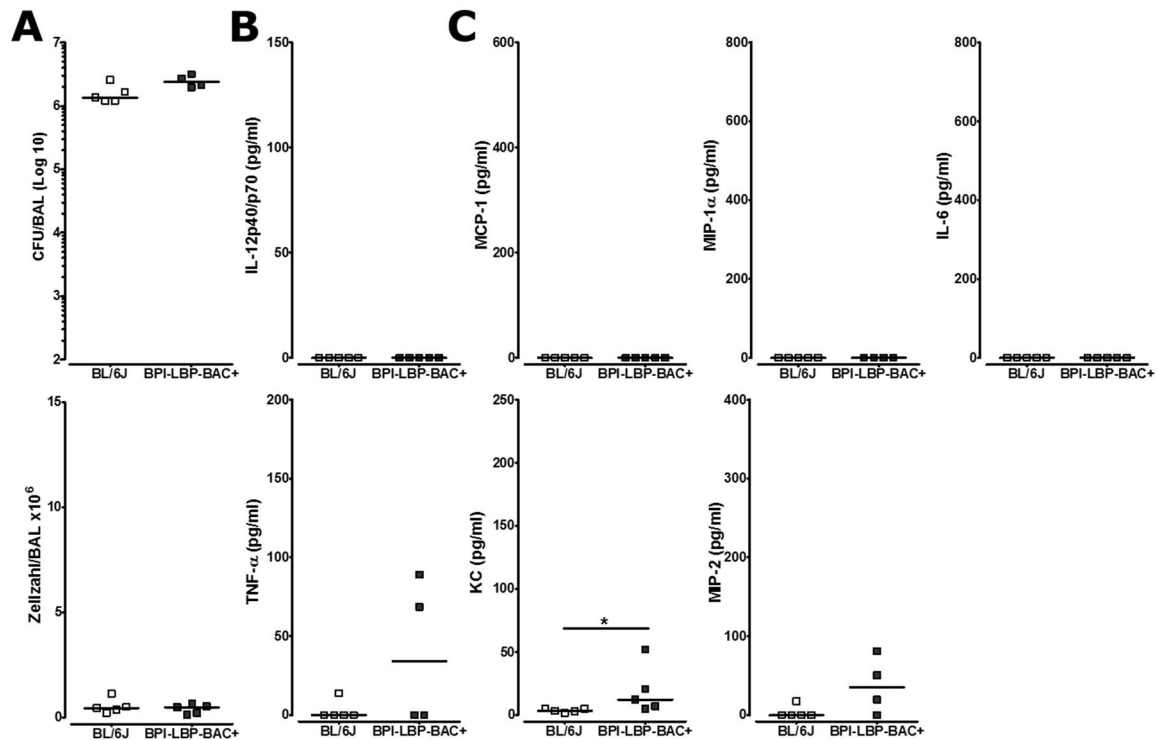
**Abbildung 31: Das Fehlen von murinem BPI wirkt sich nicht negativ auf das Abklingen der Infektion aus.**

Jeweils 5 Weibchen, im Alter von 8-12 Wochen wurden nach Isofluran-Narkotisierung intratracheal mit  $3 \times 10^6$  CFU *S. pneumoniae* 9941 inokuliert. 48 Stunden nach Infektion wurden die Versuchstiere abgetötet und eine BAL durchgeführt. Durch Ausplattierung der BALF, anschließender Anzucht und Auszählung der ÜN gewachsenen CFU (*colony forming units*) wurde die Bakterienlast in den Lungen der Tiere bestimmt (A). In der BALF wurde die Leukozytenzahl mikroskopisch bestimmt (B). Die Zytokinkonzentrationen in der BALF (C) wurden im Luminex-System analysiert. Dargestellt ist der Median eines repräsentativen Experiments. Die statistischen Auswertung erfolgte nicht-parametrisch mit dem Mann-Whitney Test (\*\*:  $p < 0,005$ ).

Nach 48 Stunden zeigten sich keine gravierenden Unterschiede mehr zwischen den beiden Gruppen. Sowohl Wildtyp- als auch BPI KO-Mäuse hatten die Bakterien in der Lunge erfolgreich eliminiert. Die Leukozytenzahl war zu diesem Zeitpunkt wieder auf einen niedrigen Wert reduziert, ebenso waren kaum noch Zytokine nachweisbar. Lediglich MCP-1 war in den Wildtypen erhöht messbar. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das Fehlen von murinem BPI transient, ca. 24 Stunden nach Infektion mit Pneumokokken bei der gewählten Infektionsdosis am ersten Tag nach Infektion zu signifikant erhöhter Bakterienlast und Entzündung führt.

### 3. Ergebnisse

Parallel wurden wieder BPI-LBP-BAC+ Tiere infiziert, um die Rolle von humanem BPI bei der Infektionsabwehr von Grampositiven Erregern zu klären.



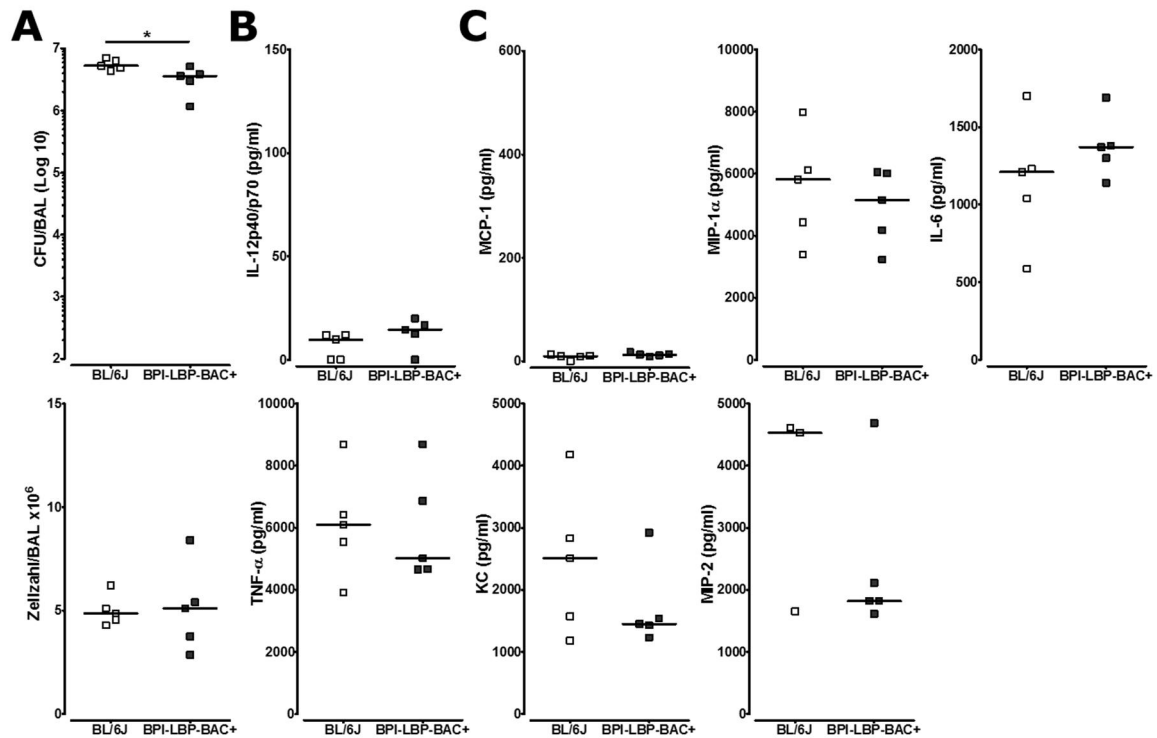
**Abbildung 32: Nachweis der applizierten Bakterien ( $3 \times 10^6$  CFU *S. pneumoniae*) 15 Minuten nach Infektion.**

Jeweils 5 Weibchen, im Alter von 8-12 Wochen wurden nach Isofluran-Narkotisierung intratracheal mit  $3 \times 10^6$  CFU *S. pneumoniae* 9941 inokuliert. 15 min nach Infektion wurden die Versuchstiere abgetötet und eine BAL durchgeführt. Durch Ausplattierung der BALF, anschließender Anzucht und Auszählung der ÜN gewachsenen CFU (*colony forming units*) wurde die Bakterienlast in den Lungen der Tiere bestimmt (A). In der BALF wurde die Leukozytenzahl mikroskopisch bestimmt (B). Die Zytokinkonzentrationen in der BALF (C) wurden im Luminex-System analysiert. Dargestellt ist der Median eines repräsentativen Experiments. Die statistischen Auswertung erfolgte nicht-parametrisch mit dem Mann-Whitney Test (\*\*:  $p < 0,005$ ).

Der erste Zeitpunkt diente auch hier zum Nachweis der korrekten Infektion mit der eingestellten Bakterienzahl. Ähnlich wie bei den BPI KO-Tieren war auch hier die Ausgangsmenge von KC im Vergleich zu der BL/6J-Gruppe erhöht.



### 3. Ergebnisse

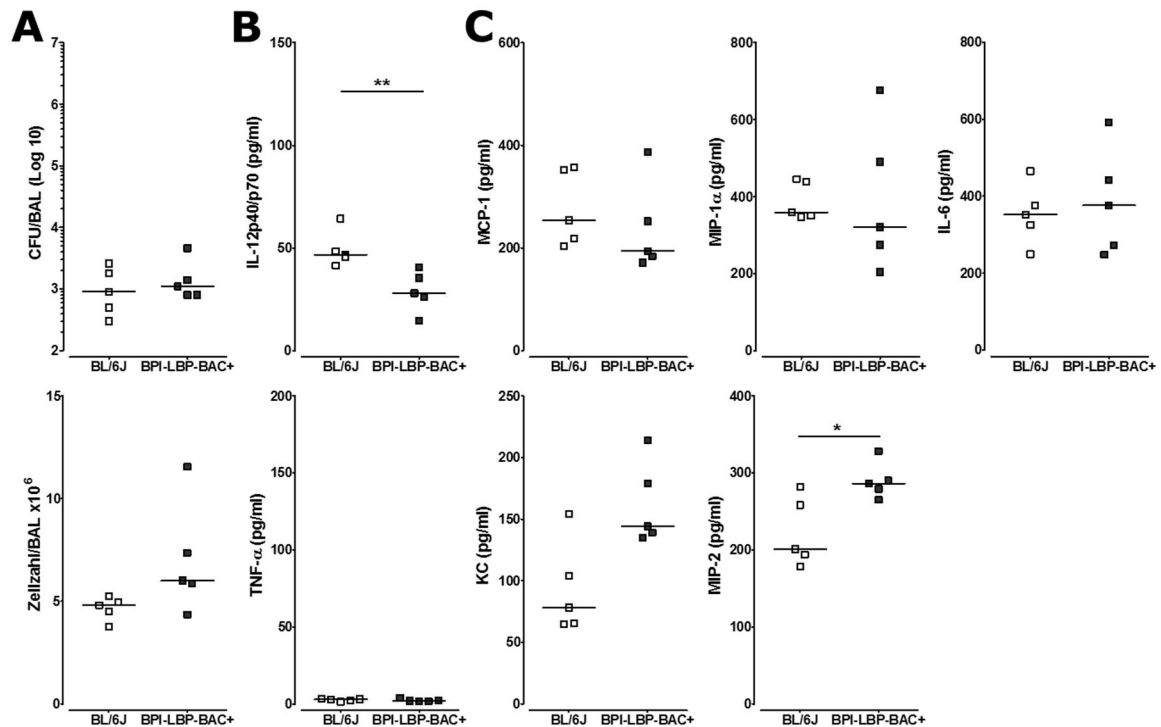


**Abbildung 33: Die für BPI und LBP humanisierten Tiere weisen nach 6 Stunden eine niedrigere Keimlast im Vergleich zu Wildtyp-Tieren auf.**

Jeweils 5 Weibchen, im Alter von 8-12 Wochen wurden nach Isofluran-Narkotisierung intratracheal mit  $3 \times 10^6$  CFU *S. pneumoniae* 9941 inokuliert. 6 Stunden nach Infektion wurden die Versuchstiere abgetötet und eine BAL durchgeführt. Durch Ausplattierung der BALF, anschließender Anzucht und Auszählung der ÜN gewachsenen CFU (*colony forming units*) wurde die Bakterienlast in den Lungen der Tiere bestimmt (A). In der BALF wurde die Leukozytenzahl mikroskopisch bestimmt (B). Die Zytokinkonzentrationen in der BALF (C) wurden im Luminex-System analysiert. Dargestellt ist der Median eines repräsentativen Experiments. Die statistischen Auswertung erfolgte nicht-parametrisch mit dem Mann-Whitney Test (\*\*:  $p < 0,005$ ).

Im frühen Infektionsverlauf scheinen die transgenen Tiere einen Vorteil bei der Eindämmung der Bakterien zu besitzen. Während bei den BL/6-Mäusen die Bakterienlast um knapp eine Log-Stufe angestiegen war, blieb diese in den BPI-LBP-BAC+ Tieren annähernd konstant. Die Zahl eingewanderter Leukozyten stieg in beiden Gruppen vergleichbar auf circa  $5 \times 10^6$  Zellen an. Die Zytokinsynthese war deutlich angelaufen, wies jedoch keine Genotyp-spezifischen Unterschiede auf.

### 3. Ergebnisse

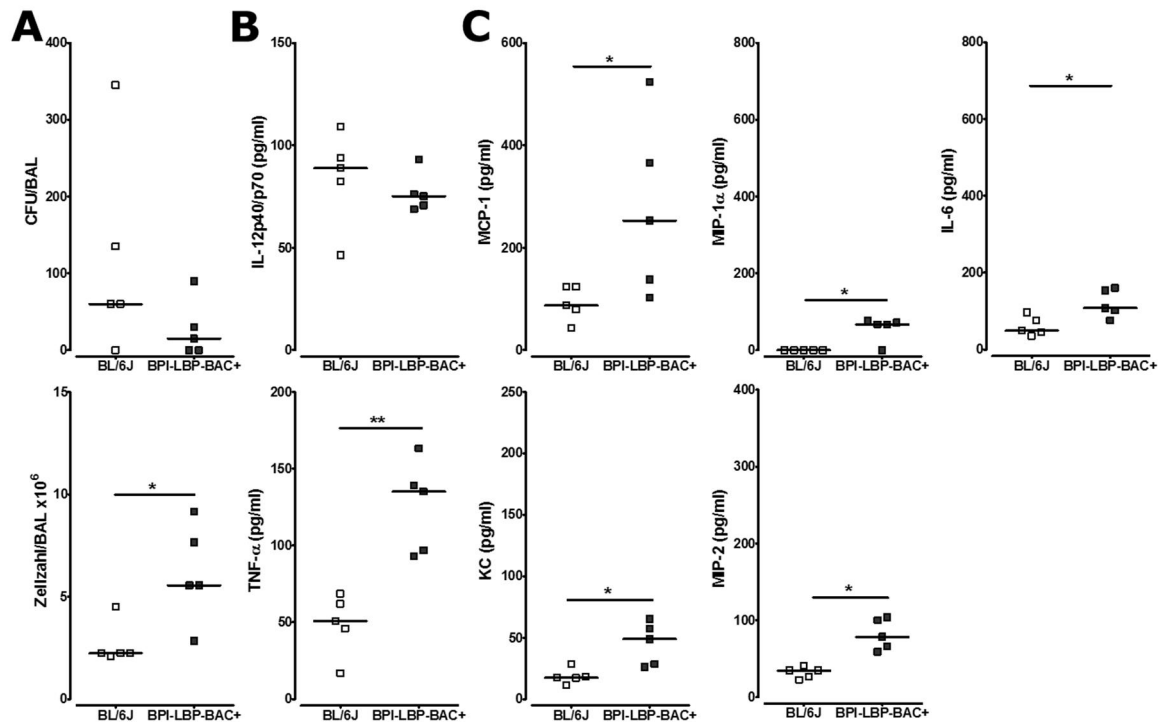


**Abbildung 34: Humanes BPI führt zu keinem verbesserten Infektionsverlauf nach 24 Stunden Infektion mit *S. pneumoniae*.**

Jeweils 5 Weibchen, im Alter von 8-12 Wochen wurden nach Isofluran-Narkotisierung intratracheal mit  $3 \times 10^6$  CFU *S. pneumoniae* 9941 inokuliert. 24 Stunden nach Infektion wurden die Versuchstiere abgetötet und eine BAL durchgeführt. Durch Ausplattierung der BALF, anschließender Anzucht und Auszählung der ÜN gewachsenen CFU (*colony forming units*) wurde die Bakterienlast in den Lungen der Tiere bestimmt (A). In der BALF wurde die Leukozytenzahl mikroskopisch bestimmt (B). Die Zytokinkonzentrationen in der BALF (C) wurden im Luminex-System analysiert. Dargestellt ist der Median eines repräsentativen Experiments. Die statistischen Auswertung erfolgte nicht-parametrisch mit dem Mann-Whitney Test (\*\*:  $p < 0,005$ ).

Humanes BPI führte nicht zu messbaren Unterschieden bei der Bekämpfung des grampositiven *S. pneumoniae* bei den gewählten experimentellen Bedingungen. Die Bakterienkonzentration in den Lungen der infizierten Tiere war in beiden Gruppen bereits 24 Stunden nach Infektion vergleichbar gesunken. Auch im Zytokinexpressionsmuster zeigten sich nur geringfügige Unterschiede bei der Expression von IL-12 und MIP-2, wobei ersteres in den transgenen Tieren erniedrigt und MIP-2 erhöht war.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 35: 48 Stunden nach Infektion ist in den BPI-LBP-BAC+ Tieren die Expression proinflammatorischer Zytokine gegenüber Kontrolltieren erhöht.**

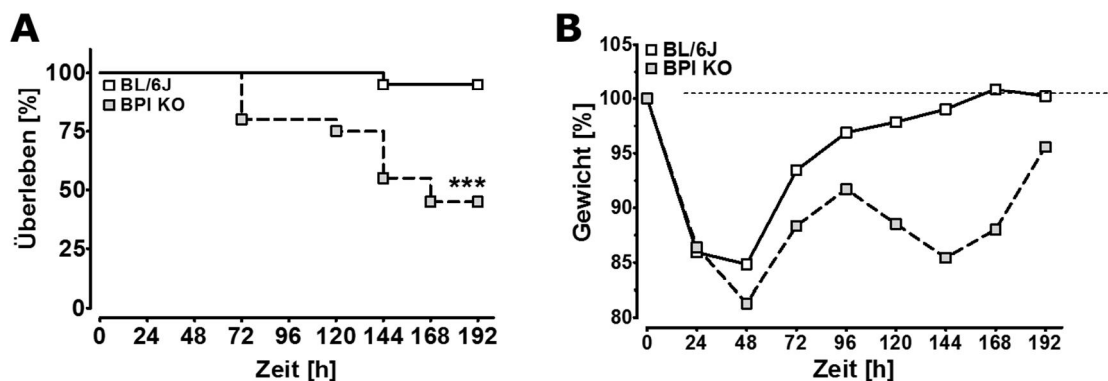
Jeweils 5 Weibchen, im Alter von 8-12 Wochen wurden nach Isofluran-Narkotisierung intratracheal mit  $3 \times 10^6$  CFU *S. pneumoniae* 9941 inokuliert. 48 Stunden nach Infektion wurden die Versuchstiere abgetötet und eine BAL durchgeführt. Durch Ausplattierung der BALF, anschließender Anzucht und Auszählung der ÜN gewachsenen CFU (*colony forming units*) wurde die Bakterienlast in den Lungen der Tiere bestimmt (A). In der BALF wurde die Leukozytenzahl mikroskopisch bestimmt (B). Die Zytokinkonzentrationen in der BALF (C) wurden im Luminex-System analysiert. Dargestellt ist der Median eines repräsentativen Experiments. Die statistischen Auswertung erfolgte nicht-parametrisch mit dem Mann-Whitney Test (\*\*:  $p < 0,005$ ).

Die Bakterien wurden in beiden Gruppen gleichermaßen eliminiert. Bei den für BPI und LBP humanisierten Tieren verbleibt jedoch eine erhöhte Zahl an Leukozyten in der Lunge. Zudem ist die Expression jedes gemessenen Zytokins, mit Ausnahme von IL-12, gegenüber den BL/6J-Mäusen signifikant erhöht. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die transgenen Tiere, im Vergleich zu den Kontrollen, die initiale Vermehrung der Bakterien verhindern konnten. Im weiteren Verlauf der Infektion ließen sich jedoch keine nennenswerten Vorteile durch das Vorhandensein von humanem BPI verzeichnen. Zu dem späten Zeitpunkt, 48 Stunden nach Infektion, zeigte sich bei den für BPI und LBP humanisierten Tieren eine im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöhte Mengen aller gemessenen Zytokine, mit Ausnahme von IL-12. Die erhöhte Zytokinmenge korrelierte mit einer ebenfalls erhöhten Menge an eingewanderten Leukozyten, welche sich bei den transgenen Tieren über den Verlauf von 6 bis 48 Stunden nicht veränderte.

### 3. Ergebnisse

#### 3.3.3 Das Fehlen von murinem BPI führt zu einer erhöhten Mortalität in der Pneumokokken-induzierten Lungeninfektion

Um zu überprüfen, welchen Einfluss die Infektionsdosis auf die Rolle von BPI bei der Pneumokokken-Lungeninfektion hatte, wurde der Versuchsaufbau verändert. Die Versuchstiere wurden zunächst wie bisher nach Isoflurannarkose intratracheal mit einer Bakteriensuspension infiziert. Nach Infektion wurden die Tiere für einen Zeitraum von 10 Tagen engmaschig beobachtet und täglich gewogen. Tiere, die sich im Versuchsverlauf nicht erholten und deren Belastungsgrad sich Stufe 3 (hochgradige Belastung, laut TierSchG) annäherte, wurden sofort euthanasiert.



**Abbildung 36: BPI-defiziente Mäuse sind deutlich susceptibler für Infektionen mit Pneumokokken.**

BL/6J- und BPI KO-Weibchen, im Alter von 8-12 Wochen, wurden mit  $1 \times 10^8$  CFU *S. pneumoniae* ATCC 49619 intratracheal instilliert. Das Überleben ist prozentual dargestellt (A). Die statistische Auswertung erfolgte hierbei mit dem *Logrank test*. Das abgebildete Ergebnis stellt die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Experimenten, mit je 10 Tieren pro Gruppe dar. Der Gewichtsverlauf ist ebenfalls prozentual dargestellt und entspricht einem repräsentativen Ergebnis von zwei unabhängigen Versuchen, mit je 10 Tieren.

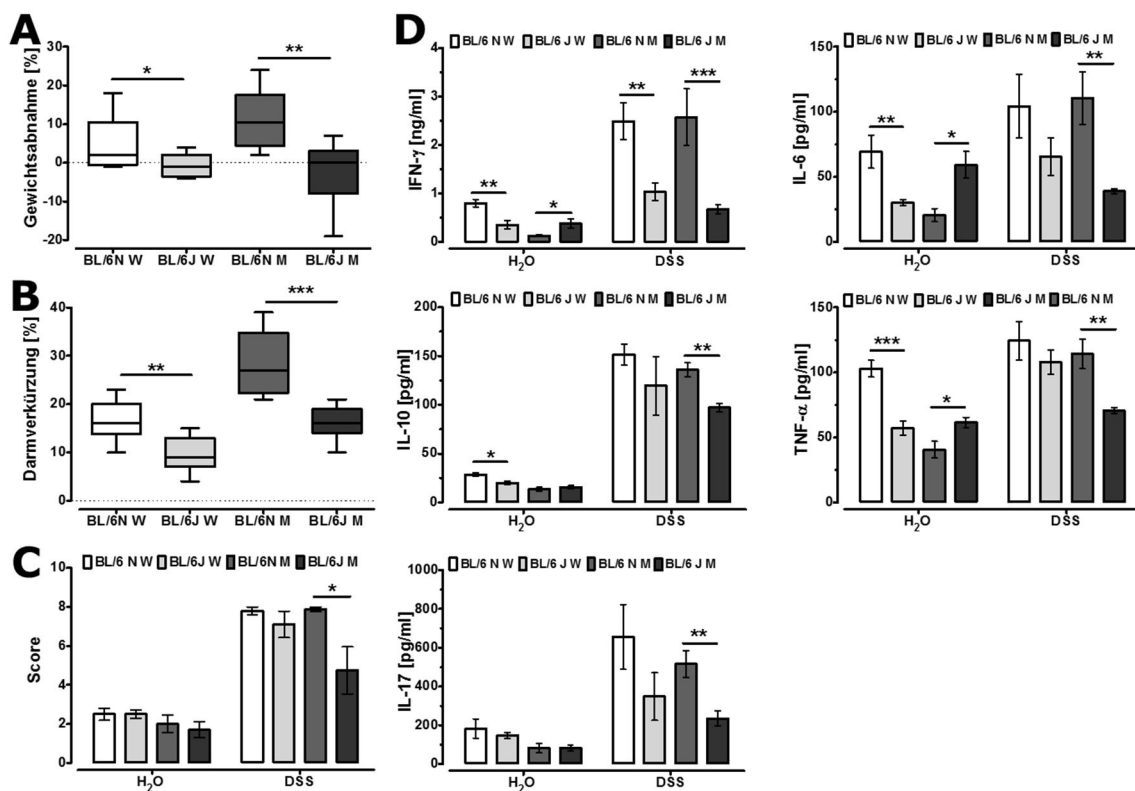
Im Verlauf der 10-tägigen Beobachtung mussten mehr als 50% der BPI-defizienten Tiere euthanasiert werden, während dies in der BL/6J-Gruppe lediglich bei einem Tier der Fall war. Der Gewichtsverlauf zeigte ebenfalls einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Im frühen Verlauf der Infektion verhielten sich beide Genotypen ähnlich. Während der ersten 48 Stunden trat ein deutlicher Gewichtsverlust auf, der sich im Folgenden jedoch bei beiden Gruppen wieder verringerte. Wildtyp-Mäuse erreichten nach ca. 168 Stunden wieder ihr Ausgangsgewicht und behielten dieses bei. Bei den BPI KO-Tieren trat im Unterschied dazu nach anfänglicher Genesung jedoch eine zweite Gewichtsabnahme nach 96 Stunden auf. Diese war von deutlichen Krankheitssymptomen begleitet und führte zur Abtötung der Tiere. Im frühen Krankheitsverlauf führte das Fehlen von murinem BPI zu keinen großen Unterschieden. Im späteren Verlauf hingegen zeigten sich jedoch drastische Auswirkungen. Die Erreger konnten durch das Fehlen von BPI nicht vollständig eliminiert werden und vermehrten sich im weiteren Verlauf unkontrolliert und verteilten sich im gesamten Organismus (Daten nicht gezeigt). Dies führte zu der signifikant verringerten Überlebensrate.

### 3. Ergebnisse

#### 3.4 Untersuchung der Darm-Mikrobiota der verschiedenen Mauslinien

##### 3.4.1 C57BL/6/N und C57BL/6/J Mauslinien weisen eine abweichende Suszeptibilität im DSS-Modell und eine unterschiedliche Zusammensetzung des Darmmikrobioms auf

Da es bislang keine Untersuchungen zur Auswirkung der genetischen Differenzen der beiden BL/6-Unterstämme, im Modell der akuten DSS-induzierten Kolitis gab, wurde dies hier getestet. Es wurden sowohl die Auswirkung des genetischen Hintergrundes, als auch die des Geschlechts der Versuchstiere untersucht. Hierfür wurden Gruppengrößen von je 5 Tieren gebildet. Die Tiere erhielten für 7 Tage 1 % DSS, im Trinkwasser gelöst. Zur Kontrolle wurden Tiere mit normalem Trinkwasser mitgeführt.



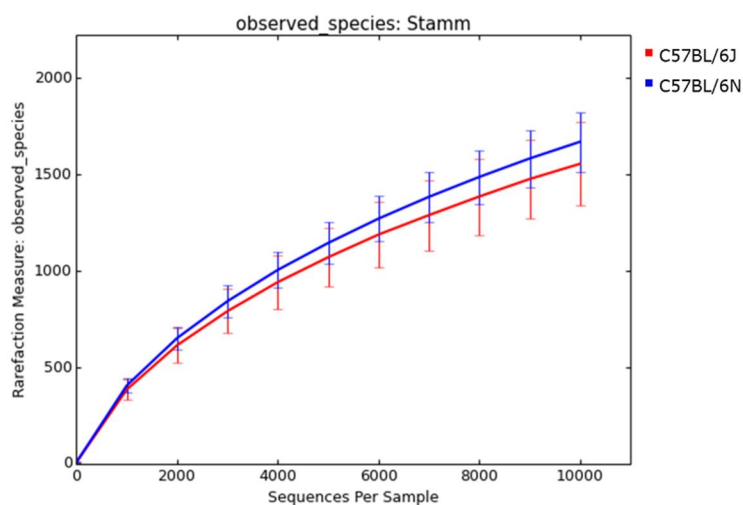
**Abbildung 37: Die beiden BL/6 Unterstämme unterscheiden sich signifikant im Modell der Dextransulfat-induzierten (DSS) Kolitis.**

Je 5 Weibchen und 5 Männchen, der beiden BL/6-Unterstämme, wurde über 7 Tage 1 % DSS, gelöst im Trinkwasser verabreicht. Das Gewicht der Tiere wurde täglich kontrolliert (A). An Tag 8 wurden die Tiere abgetötet, der Dickdarm vermessen (B) und die Zytokinproduktion in den mesenterialen Lymphknoten (D) im Luminex-System vermessen. Der histologische Score (C) wurde über die Summe aus Epithelschaden und entzündlichem Infiltrat ermittelt. Zur Kontrolle wurden Wassertiere parallel analysiert. Bei der statistischen Auswertung wurden jeweils BL/6N- gegen BL/6J-Tiere des gleichen Geschlechts gegeneinander im Mann-Whitney Test verglichen (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $p < 0,0005$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM aus 2 unabhängigen Versuche.

### 3. Ergebnisse

Bereits bei der täglichen Gewichtskontrolle wiesen die Tiere der BL/6N-Gruppe eine drastisch stärkere Gewichtsabnahme auf. Bei männlichen Tieren war dies besonders ausgeprägt. Bei Versuchsabschluss, an Tag 8, wurde die Darmlänge vermessen. In Korrelation mit der drastischen Gewichtsabnahme der BL/6N-Tiere, hatte sich die Darmlänge bei diesen Tieren enorm reduziert, wiederum mit einem deutlicheren Unterschied bei den Männchen. In Übereinstimmung mit diesen Daten, wurde bei den BL/6N-Tieren eine stärkere Entzündung des Darmepithels, verbunden mit einer massiven Infiltration von Leukozyten nachgewiesen, was sich im signifikant höheren histologische Score manifestierte. Die Expression aller gemessener proinflammatorischer Zytokine war bei den BL/6N-Gruppen deutlich stärker. Interessanter Weise zeigte diese Gruppe, auch ohne DSS-Behandlung, bereits höhere basale Zytokin-Expressionswerte.

Um detaillierte Einblicke in die Unterschiede der beiden C57BL6-Mauslinien zu erhalten, wurde eine *Next-Generation* Sequenzierung des Darmmikrobioms mit dem GS FLX+ System durchgeführt. Die erhaltenen Rohdaten zeigten über 800000 und nach Abzug aller Störfaktoren über 700000 Gesamt-16sR-DNA-Sequenzen. Die Anzahl war gleichmäßig auf die beiden Stämme verteilt (Daten nicht gezeigt). Die ausgewerteten Sequenzen pro Probe lagen zwischen 13398 und 27609 und wurden auf 10000 normiert. Zur Qualitätssicherung wurde in einem ersten Schritt ein *Rarefaction*-Plot erstellt.

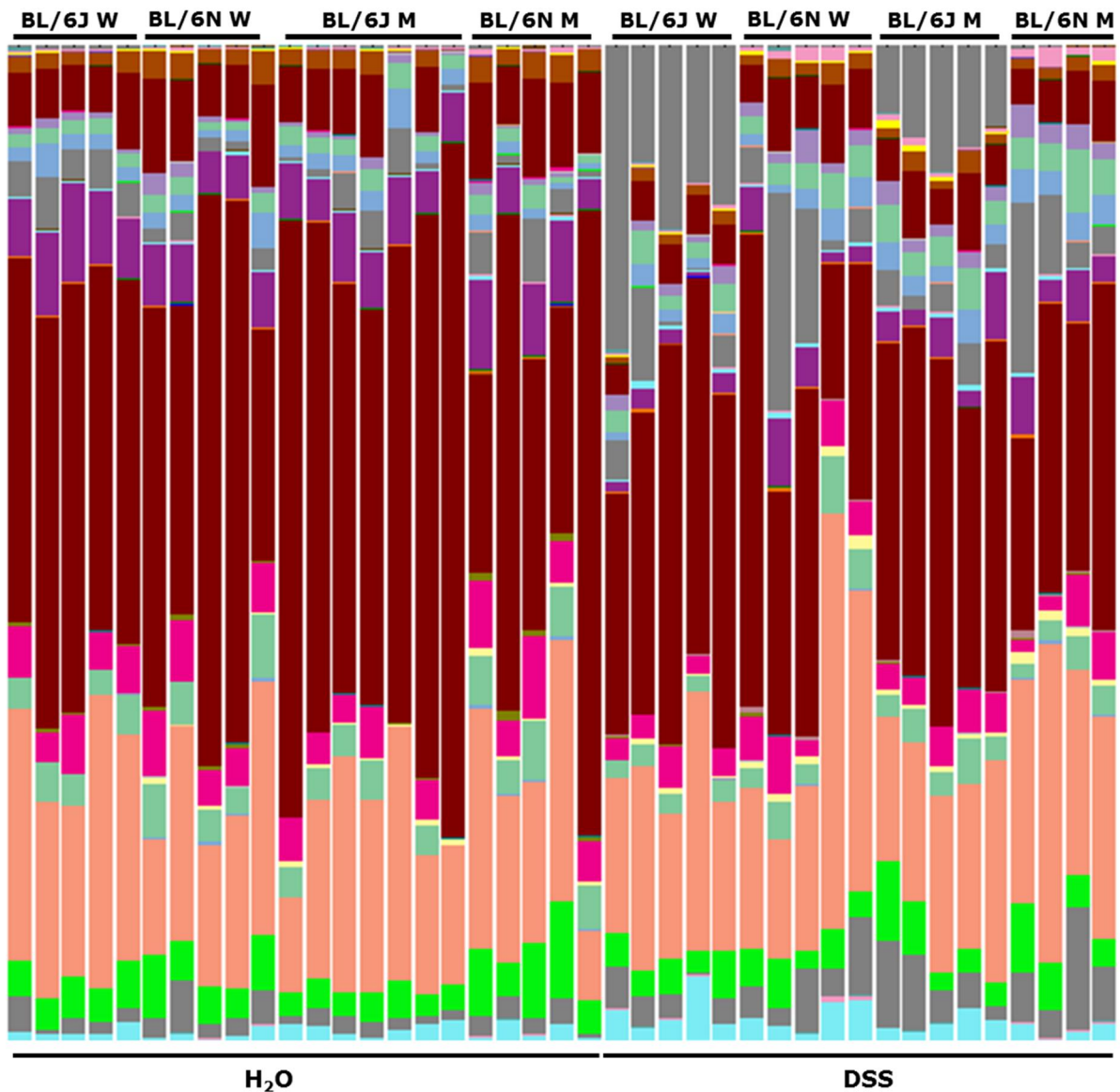


**Abbildung 38: Rarefaction-Kurve der nachgewiesenen Spezies, auf 10000 Sequenzen normiert.**

Beide Kurven gehen in eine Sättigung über, somit konnte sichergestellt werden, dass für die Analysen genügend Sequenzen zur Verfügung standen und sich diese zwischen den BL/6-Unterstämmen nicht wesentlich unterschieden. Dargestellt ist die Kurve für den Stamm C57BL/6J (n=19) in rot und für C57BL/6N (n=22) in blau.

Die erhaltenen Kurven gingen für beide Stämme in eine Sättigung über und garantierten somit eine ausreichend hohe Spezieszahl für eine qualitative Untersuchung der Mikrobiomzusammensetzung bei den beiden BL/6-Unterstämmen. Um einen ersten Eindruck der relativen Häufigkeit verschiedener Spezies zu erhalten wurde aus den Daten ein *Taxa-Summary-Plot* erstellt.

### 3. Ergebnisse

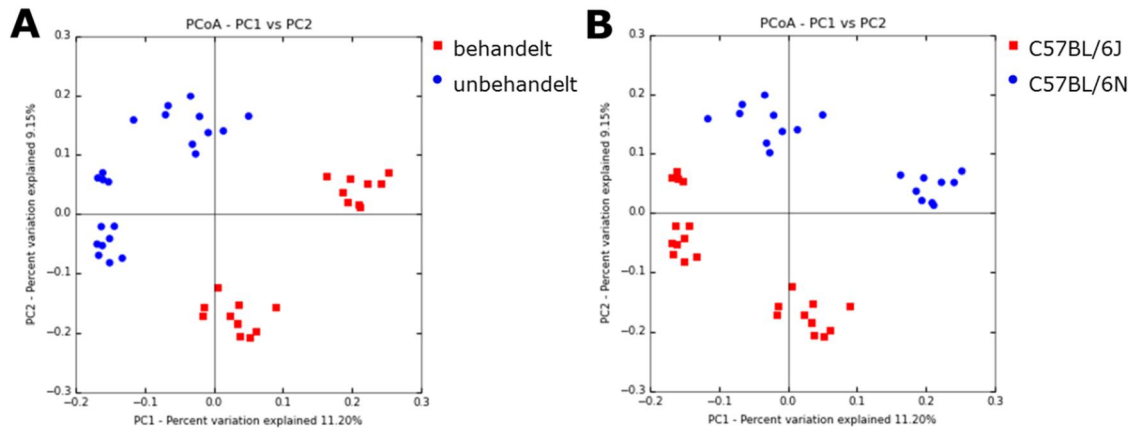


**Abbildung 39: Taxa-Summary-Plot.**

Dargestellt ist die relative Häufigkeit der verschiedenen Taxa auf Genus-Ebene (Details im Anhang). Verglichen wurden unbehandelte sowie behandelte Tiere, BL/6J und BL/6N, sowie Männchen und Weibchen.

Bei der Verteilung im Taxa-Summary-Plot fiel ein Unterschied deutlich auf. In der DSS-Gruppe trat bei den C57BL/6J-Tieren der Genus *Akkermansia* in deutlich höherer Abundanz auf. Zur weiteren Differenzierung der Mikrobiomkomposition der beiden Unterstämme wurde eine *Principal coordinate* Analyse (PCoA) durchgeführt.

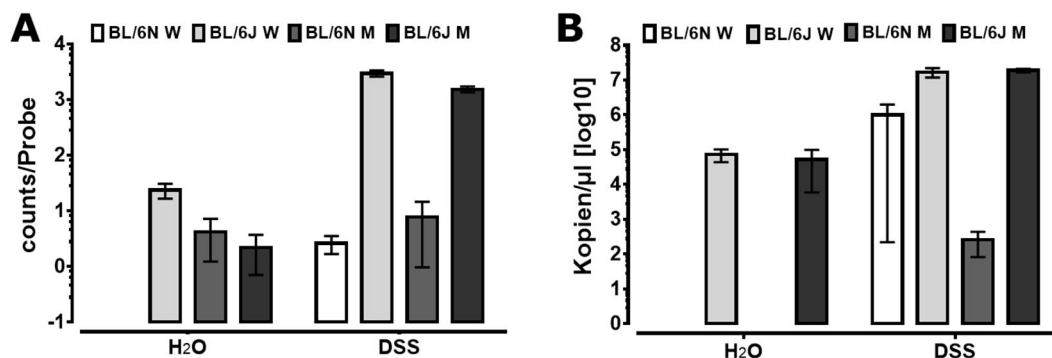
### 3. Ergebnisse



**Abbildung 40: Principal coordinate analysis (PCoA) plot.**

Analysiert nach Behandlung (A) und Stamm (B) zeigt sich deutlich, dass sich die beiden Gruppen voneinander unterscheiden und die Behandlung zudem eine Veränderung bewirkt.

Die Administration von DSS verursacht eine Veränderung des Darmmikrobioms. Für diese Untersuchung entscheidender war jedoch die festgestellte unterschiedliche Mikrobiom-Zusammensetzung zwischen den BL/6-Unterstämmen. Da der deutlichste Unterschied im Genus *Akkermansia* lag, wurde dieser herausgegriffen und genauer untersucht.



**Abbildung 41: Nachweis von *Akkermansia muciniphila* mittels NGS und qRT-PCR.**

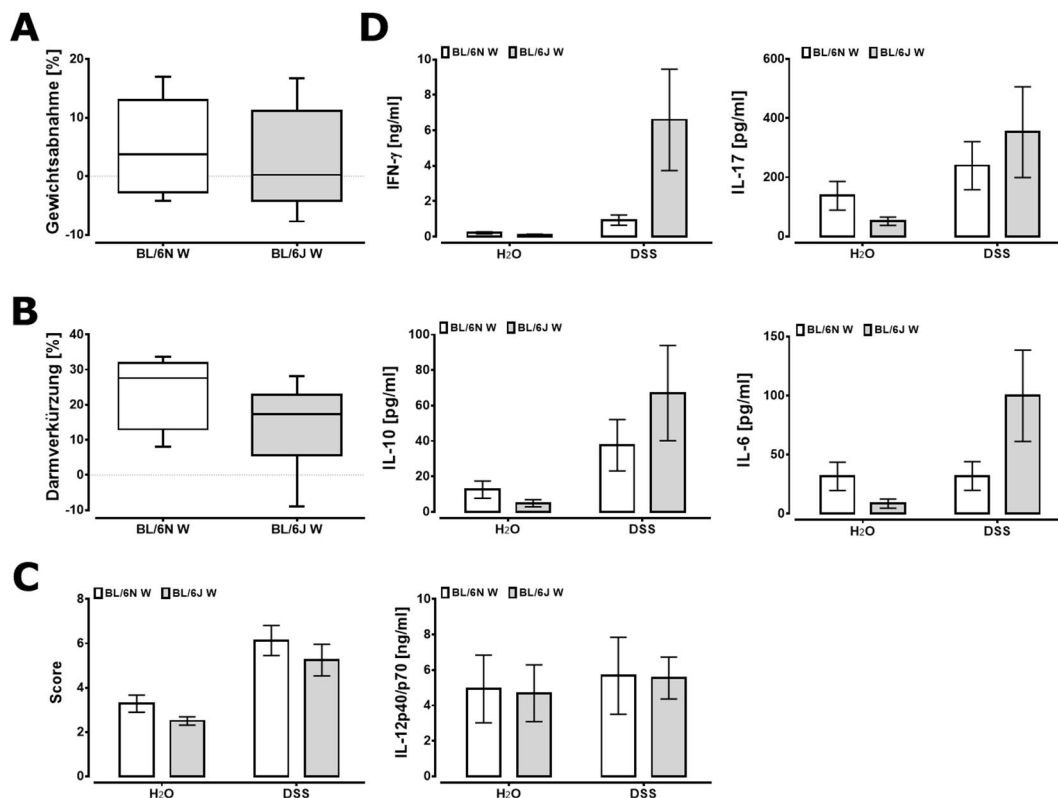
Aus der extrahierten Stuhl-DNA wurde mittels Next Generation Sequencing (A) und qRT-PCR (B) *Akkermansia muciniphila* nachgewiesen. (A) Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM aus einem exemplarischen Versuch mit je 5 Tieren pro Gruppe. (B)

Auf Speziesebene wurde *Akkermansia muciniphila* bei behandelten BL/6J-Tieren in erhöhtem Maße vorgefunden. BL/6N-Tiere wiesen diese Spezies kaum auf. Da im Verlauf der Kolitis BL/6N-Tiere stärker betroffen waren, könnte *Akkermansia muciniphila* im Modell der akuten DSS-induzierten Kolitis eine schützende Funktion haben. Um die Daten abzusichern, wurden zusätzliche quantitative PCR-Analysen für *A. muciniphila* durchgeführt um die Befunde aus der 16sR-DNA-Sequenzierung zu validieren. Wie bereits aus den Sequenzierungen hervorgegangen war unterschieden sich die beiden BL/6-Unterstämmen



### 3. Ergebnisse

deutlich voneinander. Die festgestellte Kopienzahl für *A. muciniphila* lag bei BL/6J-Mäusen deutlich höher als bei BL/6N-Mäusen und bestätigte damit die Sequenzierungsanalysen. Um die mögliche Rolle von *A. muciniphila* im Modell der akuten Kolitis weiter zu untersuchen wurden sogenannte *co-housing* Experimente durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 5 Weibchen BL/6J mit 5 Weibchen BL/6N, gleichen Alters, über einen Zeitraum von 3 Wochen zusammen in einem Käfig gehalten. Direkt im Anschluss wurde eine akute Kolitis, über einen Zeitraum von 7 Tagen induziert. Zur Kontrolle wurden analog unbehandelte Mäuse gehalten. Die Versuchsdurchführung erfolgte anschließend wie in den vorangegangenen Experimenten.



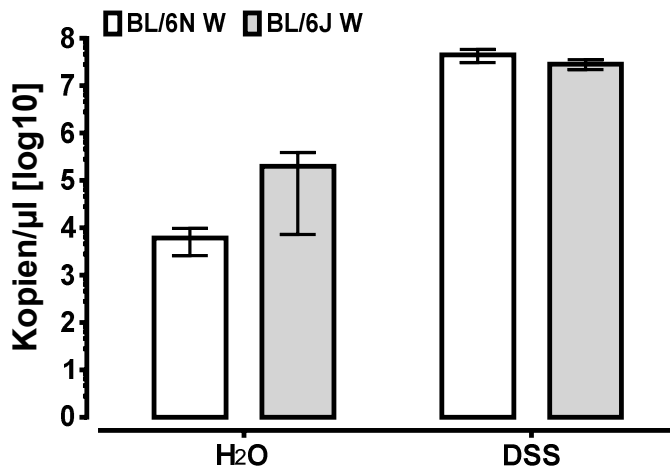
**Abbildung 42: Durch das *co-housing* wurden die Unterschiede zwischen den beiden BL/6-Unterstämmen aufgehoben.**

Je 5 Weibchen C57BL/6N und C57BL/6J, im Alter von 4 Wochen, wurden über 3 Wochen zusammen in einem Käfig gehalten. Im Anschluss wurde über 7 Tage 1 % DSS, gelöst im Trinkwasser verabreicht. Das Gewicht der Tiere wurde täglich kontrolliert (A). Am Tag 8 wurden die Tiere abgetötet, der Dickdarm vermessen (B) und die Zytokinproduktion in den mesenterialen Lymphknoten (D) im Luminex-System vermessen. Der histologische Score (C) wurde über die Summe aus Epithelschaden und entzündlichem Infiltrat ermittelt. Zur Kontrolle wurden Wassertiere parallel analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM aus 2 unabhängigen Experimenten.

Die klinischen Daten zeigten keine deutlichen Unterschiede mehr zwischen den beiden BL/6-Unterstämmen. Da sich der Verlauf der akuten Kolitis in beiden Gruppen gleichermaßen auswirkte lag die Vermutung nahe, dass das *co-housing* zu einer Angleichung im Mikrobiom geführt hat. Da in den vorangegangenen Versuchen bei den

### 3. Ergebnisse

weniger stark betroffenen BL/6J-Tieren eine erhöhte Kopienzahl an *A. muciniphila* nachgewiesen werden konnte und dies mit einem verbessertem Verlauf der Kolitis korrelieren könnte, wurde auch in diesem Experiment die Kopienzahl für *A. muciniphila* mittels qRT-PCR bestimmt.



**Abbildung 43:** Die Kopienzahl für *Akkermansia muciniphila* hat sich nach dem *co-housing* zwischen den Gruppen angeglichen.

Aus der aufgereinigten Stuhl-DNA wurde mittels spezifischer *Primer* in einer qRT-PCR die Kopienzahl für *Akkermansia muciniphila* mit Hilfe eines Standardplasmids analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM aus zwei unabhängigen Experimenten mit je 5 Tieren pro Gruppe.

Wie aus den klinischen Daten zu vermuten war, hat sich die Konzentration an *Akkermansia* zwischen den beiden BL/6-Unterstämmen, durch die Haltung in einem Käfig angeglichen. Somit könnte *Akkermansia muciniphila* tatsächlich für den milderen Verlauf der Kolitis verantwortlich sein.

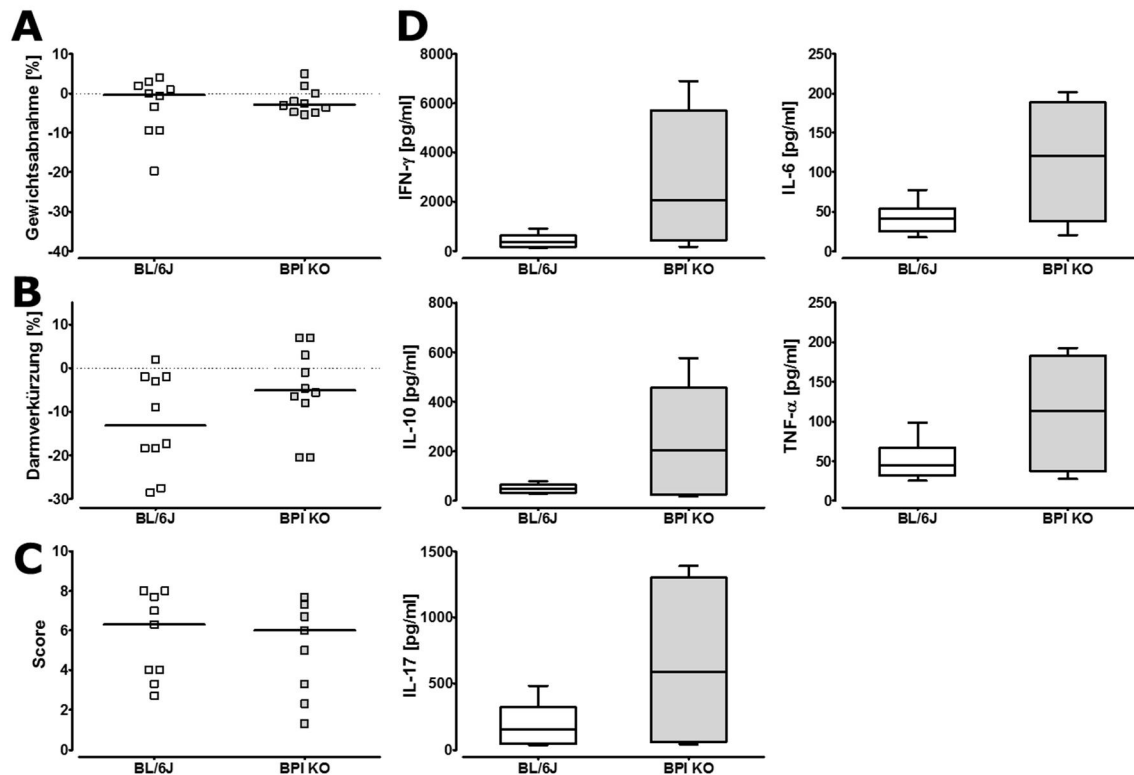
#### 3.4.2 Die Rolle von BPI im Modell der Dextransulfat-induzierten Kolitis

##### 3.4.2.1 BPI in der akuten DSS-induzierten Kolitis

Die Rolle von BPI bei entzündlichen Erkrankungen des Darms sollte im Modell der akuten DSS-induzierten Kolitis untersucht werden. Die Versuchstiere erhielten hierzu über einen Zeitraum von 7 Tagen 1 % DSS gelöst im Trinkwasser. Untersucht wurden Gewichtsabnahme, Verkürzung des Dickdarms, Entzündung und Infiltration im Darmepithel, sowie die Zytokinexpression in den mesenterialen Lymphknoten. Die Gewichtsabnahme wurde stets prozentual im Vergleich zum Ausgangsgewicht angegeben. Die Darmlänge, von Caecum bis Rektum, wurde als prozentuale Verkürzung im Vergleich zu unbehandelten Tieren angegeben. Der histologische Score wurde mikroskopisch bestimmt und setzte sich aus Epithelschaden und entzündlichem Infiltrat zusammen. Beide Kriterien wurden auf einer Scala von 0-4 eingestuft und anschließend addiert. Der maximal

### 3. Ergebnisse

zu erreichende Score war somit 8. Im ersten Schritt wurde die Funktion von murinem BPI untersucht. Hierzu wurden BPI KO- und BL/6J-Mäuse im Vergleich getestet.



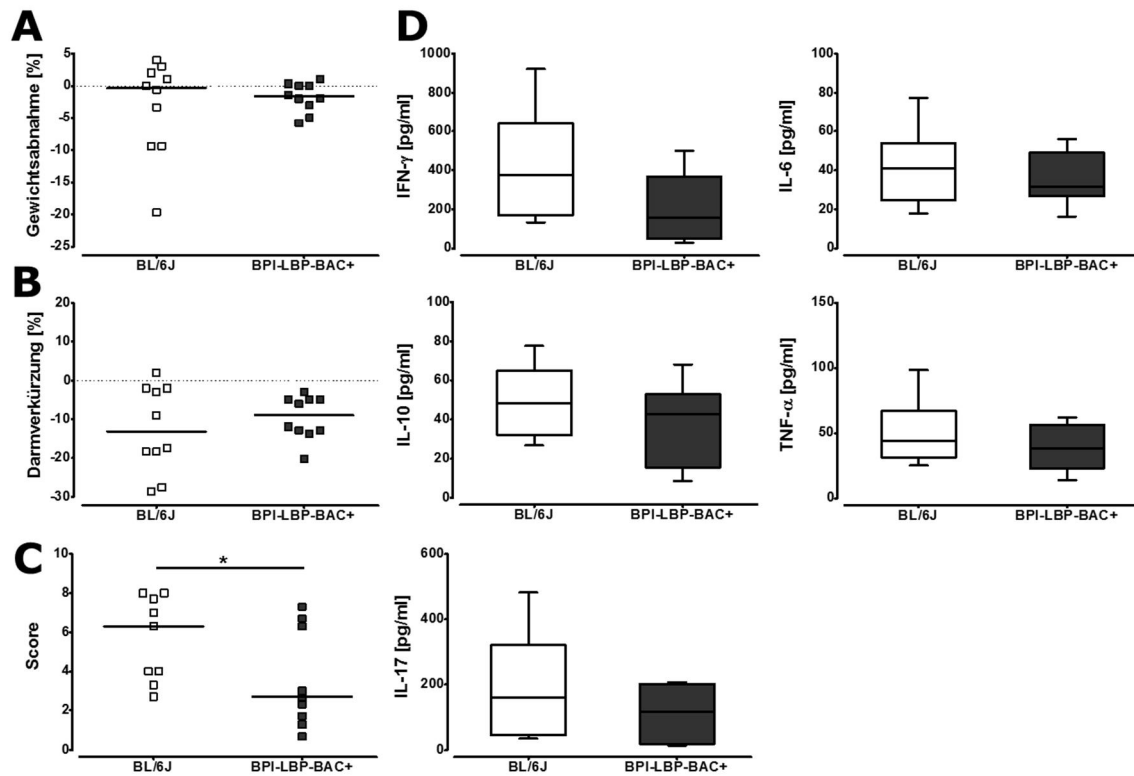
**Abbildung 44: Das Fehlen von murinem BPI wirkt sich nicht auf den Verlauf einer akuten DSS-induzierten Kolitis aus.**

Jeweils 5 BL/6J- und BPI KO-Männchen, im Alter von 8-12 Wochen, wurde für 7 Tage 1 % DSS im Trinkwasser verabreicht. Die Tiere wurden täglich gewogen (A). An Tag 8 wurden die Tiere abgetötet, die Darmlänge, von Caecum bis Rektum vermessen und die prozentuale Verkürzung angegeben (B). Die Expression inflammatorischer Zytokine, in den mesenterialen Lymphknoten (D), wurde im Luminex-System vermessen. Die histologische Score (C) wurde aus dem Epithelschaden und dem entzündlichen Infiltrat ermittelt. Dargestellt sind die Mediane aus 2 unabhängigen Experimenten. Zur statistischen Auswertung wurde der Mann-Whitney Test angewendet.

Das Fehlen von murinem BPI zeigt im Modell der akuten DSS-induzierten kaum eine Wirkung. Die Gewichtsabnahme war bei beiden Gruppen gleichermaßen sehr gering. Bei der Untersuchung von Länge und Entzündung des Darms traten in beiden Gruppen große Schwankungen auf und somit waren keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. Bei der Zytokinmessung waren ebenfalls keine signifikanten Auswirkungen zu detektieren.

Um die Rolle von humanem BPI zu untersuchen wurde der Versuch parallel mit BPI-LBP-BAC+ Tieren durchgeführt.

### 3. Ergebnisse



**Abbildung 45: Humanes BPI vermindert die Epithelschädigung und Entzündung im Modell der akuten DSS-induzierten Kolitis.**

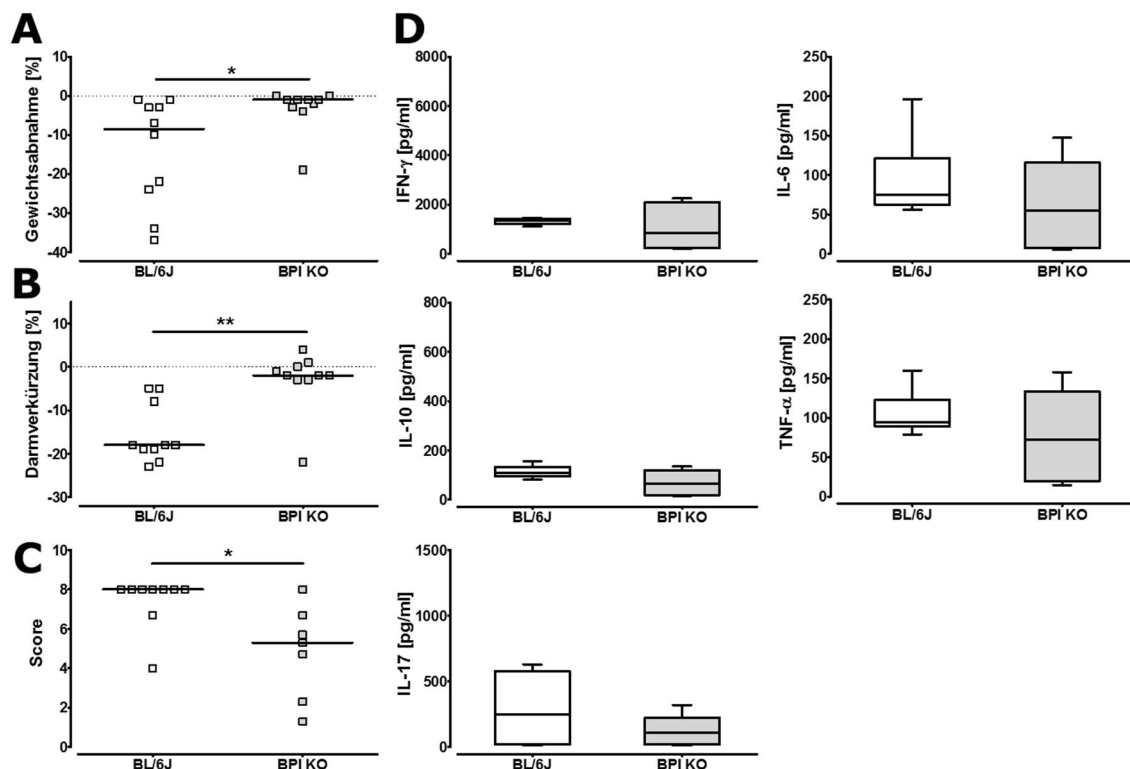
Jeweils 5 BL/6J- und BPI-LBP-BAC-Männchen, im Alter von 8-12 Wochen, wurde für 7 Tage 1 % DSS im Trinkwasser verabreicht. Die Tiere wurden täglich gewogen (A). An Tag 8 wurden die Tiere abgetötet, die Darmlänge, von Caecum bis Rektum vermessen und die prozentuale Verkürzung angegeben (B). Die Expression inflammatorischer Zytokine, in den mesenterialen Lymphknoten (D), wurde im Luminex-System vermessen. Die histologische Score (C) wurde aus dem Epithelschaden und dem entzündlichen Infiltrat ermittelt. Dargestellt sind die Mediane aus 2 unabhängigen Experimenten. Zur statistischen Auswertung wurde der Mann-Whitney Test angewendet (\* $p < 0,05$ ).

Es waren keinerlei Unterschiede in der prozentualen Gewichtsabnahme, Darmverkürzung und Zytokinexpression zu verzeichnen. Bei der mikroskopischen Untersuchung des Darmepithels trat eine große Streuung auf wobei die transgenen Mäuse tendenziell mit einem um 3 Punktwerte geringeren Score weniger stark belastet waren. Zusammenfassend ließ sich weder für murines noch humanes BPI eine wesentliche Rolle bei der akuten DSS-induzierten Kolitis feststellen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.4.2.2 Der Einfluss von BPI auf die Regeneration nach einer akuten Kolitis

Da im Modell der akuten DSS-induzierten Kolitis keine signifikante Rolle für BPI festgestellt werden konnte, wurde im Weiteren die Funktion von BPI bei der Erholung nach Kolitis untersucht. Hierfür erhielten die Versuchstiere im Anschluss an die 7 Tage DSS nochmals 6 Tage normales Trinkwasser, bevor die Tiere an Tag 13 abgetötet und untersucht wurden. Das Gewicht wurde während des Versuches täglich ermittelt. Die untersuchten Parameter blieben unverändert. Analysiert wurde zuerst die Funktion von murinem BPI anhand von BPI-defizienten, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen.



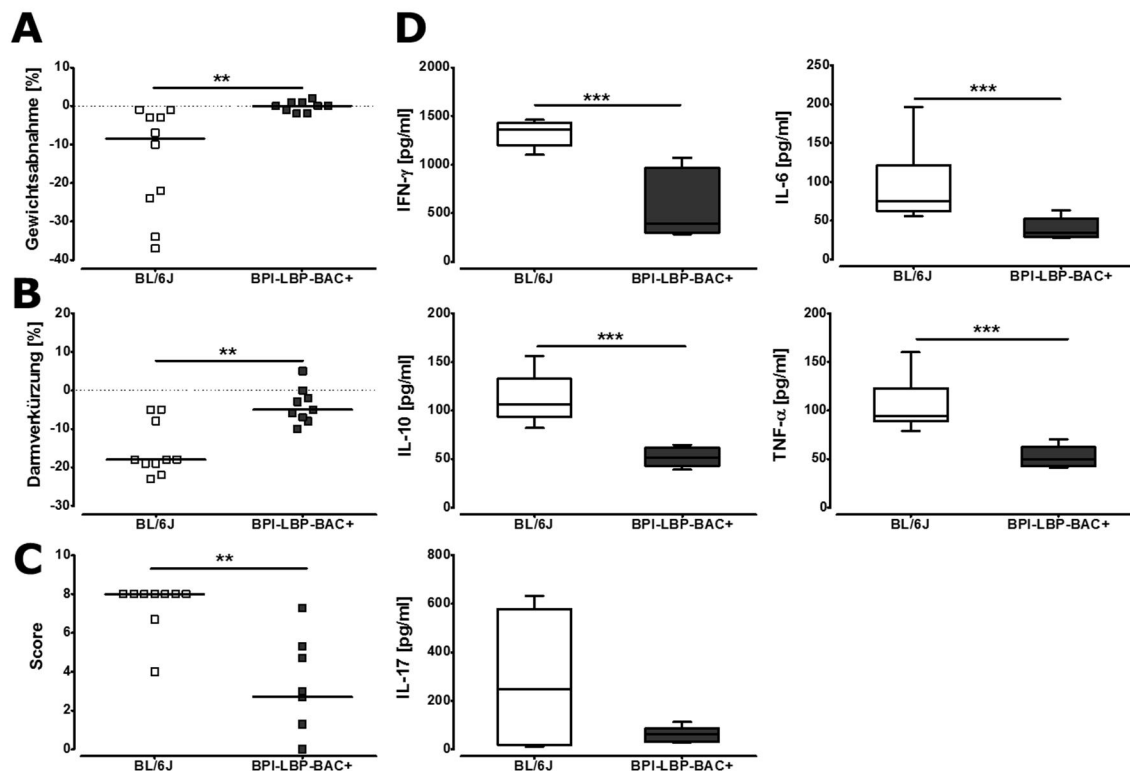
**Abbildung 46: Das Fehlen von murinem BPI wirkt sich positiv auf die Regeneration nach einer akuten Kolitis aus.**

Jeweils 5 BL/6J- und BPI KO-Männchen, im Alter von 8-12 Wochen, wurde für 7 Tage 1 % DSS im Trinkwasser verabreicht, daran schlossen sich 6 Tage mit normalem Trinkwasser an. Die Tiere wurden täglich gewogen (A). An Tag 13 wurden die Tiere abgetötet, die Darmlänge, von Caecum bis Rektum vermessen und die prozentuale Verkürzung angegeben (B). Die Expression inflammatorischer Zytokine, in den mesenterialen Lymphknoten (D), wurde im Luminex-System vermessen. Die histologische Score (C) wurde aus dem Epithelschaden und dem entzündlichen Infiltrat ermittelt. Dargestellt sind die Mediane aus 2 unabhängigen Experimenten. Zur statistischen Auswertung wurde der Mann-Whitney Test angewendet (\*p < 0,05; \*\*p < 0,005).

Während murines BPI innerhalb der ersten 8 Tage einer akuten Kolitis keine große Rolle spielte, änderte sich dies in den im weiteren Verlauf drastisch. Wildtyp-Mäuse verloren von Tag 8 bis Tag 13 weiterhin enorm an Gewicht, während BPI-defiziente Tiere wieder annähernd ihr Ausgangsgewicht erreichten. Noch deutlicher zeigte sich der Unterschied in der prozentualen Darmverkürzung. Bei BPI KO-Tieren war kaum noch eine Verkürzung

### 3. Ergebnisse

sichtbar. Bei den BL/6J-Tieren trat eine extreme Verkürzung um bis zu 25 % auf. Dies spiegelte sich in der histologischen Untersuchung deutlich wieder. Obwohl in der BPI-defizienten Gruppe große Schwankungen zu beobachten waren, hatten sich Entzündung und Infiltrat auf einen Wert von 5 reduziert. Die Wildtypen zeigten jedoch fast ausschließlich Maximalscores von 8, was auf eine drastische Schädigung des Darmepithels und starke Infiltration zurückzuführen war. Bei der Zytokinexpression ließen sich keine eindeutigen Unterschiede feststellen, wobei die Werte bei den BPI KO-Mäusen tendenziell niedriger lagen. Im weiteren Verlauf wurde die Rolle von humanem BPI in diesem Modell durch Untersuchung der für BPI und LBP humanisierten Mäuse getestet.



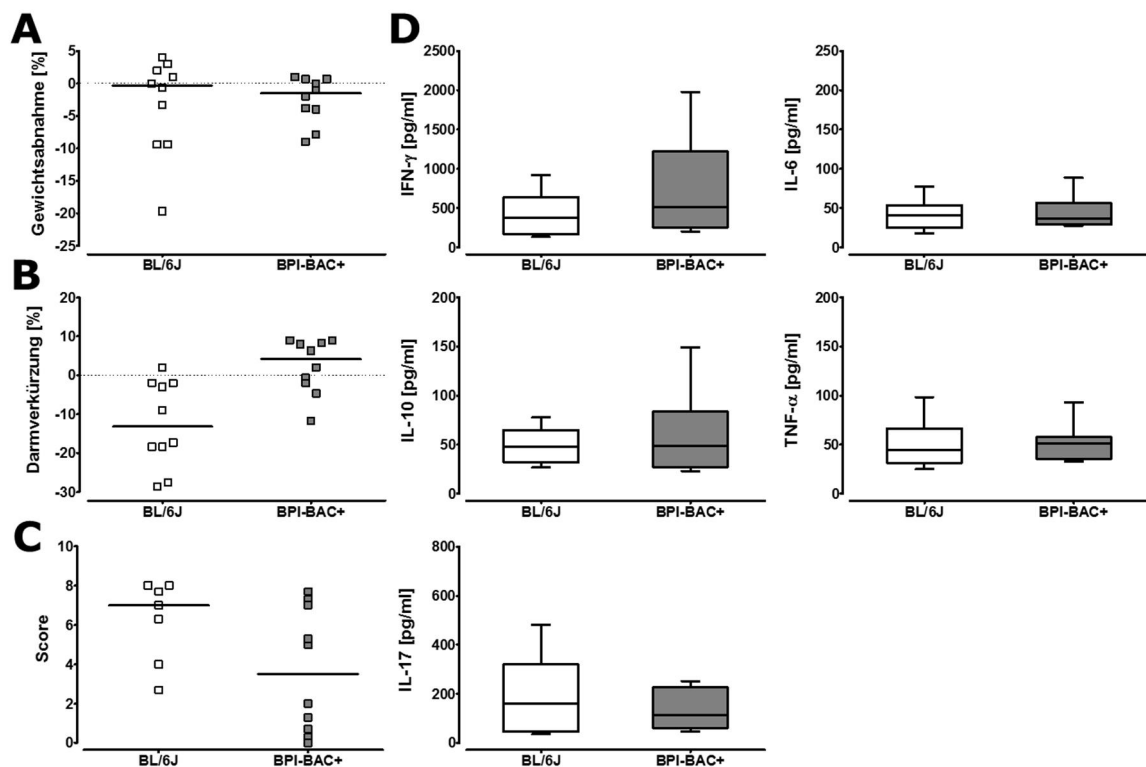
**Abbildung 47: Das Fehlen von murinem BPI in Kombination mit der Anwesenheit von humanem BPI verstärkt den Effekt einer verbesserten Regeneration nach einer akuten Kolitis.**

Jeweils 5 BL/6J- und BPI-LBP-BAC-Männchen, im Alter von 8-12 Wochen, wurde für 7 Tage 1 % DSS im Trinkwasser verabreicht, daran schlossen sich 6 Tage mit normalem Trinkwasser an. Die Tiere wurden täglich gewogen (A). An Tag 13 wurden die Tiere abgetötet, die Darmlänge, von Caecum bis Rektum vermessen und die prozentuale Verkürzung angegeben (B). Die Expression inflammatorischer Zytokine, in den mesenterialen Lymphknoten (D), wurde im Luminex-System vermessen. Die histologische Score (C) wurde aus dem Epithelschaden und dem entzündlichen Infiltrat ermittelt. Dargestellt sind die Mediane aus 2 unabhängigen Experimenten. Zur statistischen Auswertung wurde der Mann-Whitney Test angewendet (\*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,0005$ ).

Der durch das Fehlen von murinem BPI verursachte Effekt einer verbesserten Regeneration nach einer akuten Kolitis wurde durch das Vorhandensein von humanem BPI noch verstärkt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen traten noch deutlicher hervor. Sowohl die Gewichtsabnahme, als auch die Verkürzung des Darms, war bei Wildtyp-Tieren

### 3. Ergebnisse

drastisch. Der histologische Score hatte sich bei den transgenen Tieren auf einen Durchschnittswert von 3 verringert, während die BL/6J-Tier bei einem Score von 8 lagen. Im Gegensatz zum Vergleich von KO- und Wildtyp-Tieren waren nun auch bei der Zytokinmessung signifikante Unterschiede messbar. Durch das Vorhandensein von humanem BPI, in Abwesenheit von murinem BPI, war die Zytokinexpression in den mesenterialen Lymphknoten hoch signifikant geringer. Im Modell der Regeneration nach einer akuten Kolitis, zeigte sich, dass sowohl murines als auch humanes BPI eine wesentliche Rolle spielen. Das Fehlen von murinem BPI scheint die Genesung deutlich zu beschleunigen. Dieser Effekt kann durch humanes BPI noch verstärkt werden. Da in der transgenen Maus zusammen mit humanem BPI auch humanes LBP mit eingebracht wurde, wurde in einer abschließenden Versuchsreihe geklärt, ob dies einen Einfluss auf die erhaltenen Ergebnisse hat. Hierfür wurden die Versuche analog mit BPI-BAC+ Mäusen durchgeführt. Diese Linie, war bei der Generation der BPI-LBP-BAC+ Linie durch einen Bruch im BAC-Konstrukt, exakt zwischen BPI und LBP entstanden. Somit ist diese Maus defizient für murines BPI, besitzt humanes BPI, aber nicht zusätzlich humanes LBP.

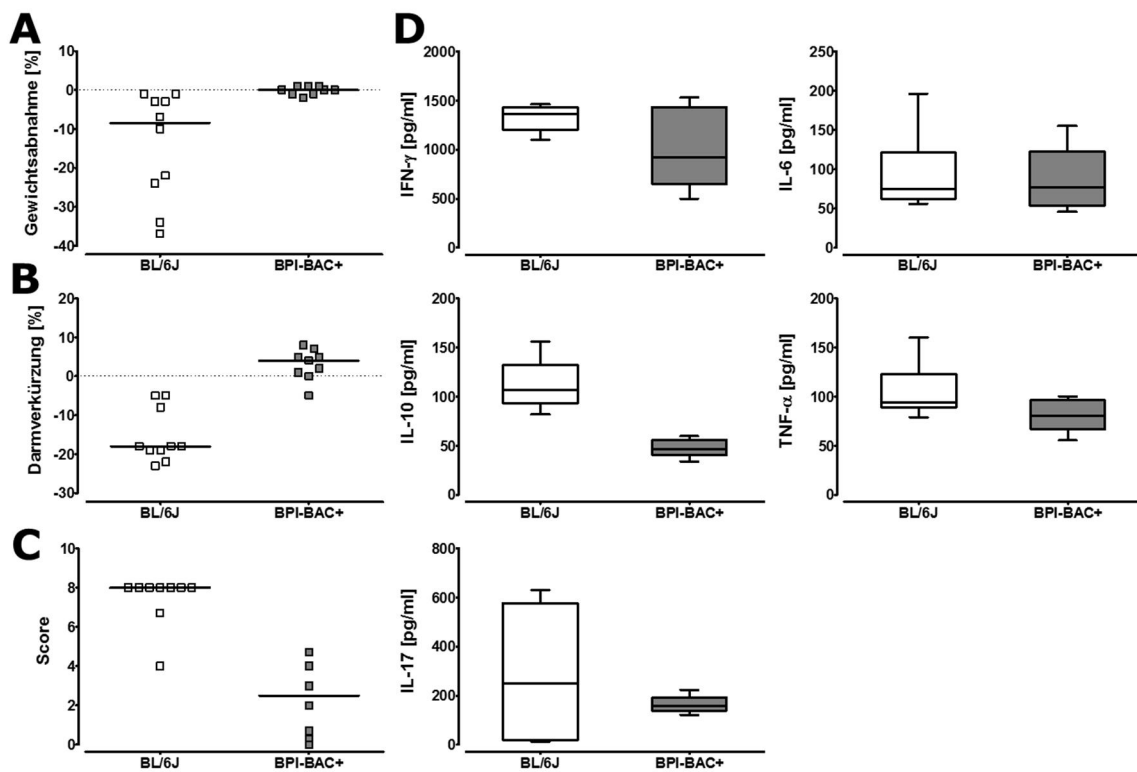


**Abbildung 48: Auch die BPI-BAC+ Maus zeigt einen abgeschwächten Verlauf der akuten DSS-induzierten Kolitis.**

Jeweils 5 BL/6J- und BPI-BAC-Männchen, im Alter von 8-12 Wochen, wurde für 7 Tage 1 % DSS im Trinkwasser verabreicht. Die Tiere wurden täglich gewogen (A). An Tag 8 wurden die Tiere abgetötet, die Darmlänge, von Caecum bis Rektum vermessen und die prozentuale Verkürzung angegeben (B). Die Expression inflammatorischer Zytokine, in den mesenterialen Lymphknoten (D), wurde im Luminex-System vermessen. Die histologische Score (C) wurde aus dem Epithelschaden und dem entzündlichen Infiltrat ermittelt. Dargestellt sind die Mediane aus 2 unabhängigen Experimenten.

### 3. Ergebnisse

Auch in der nur für BPI humanisierten Maus zeigt sich eine leicht verminderte Gewichtsabnahme und eine weniger starke Verkürzung des Darms. Die Epithelschädigung und Entzündung im Darm liegen ebenfalls unterhalb des Durchschnittswertes von Wildtyp-Mäusen. Aufgrund größerer Schwankungen innerhalb der Gruppe, zeigt sich in diesem Experiment jedoch keine signifikante Auswirkung beim histologischen Score. Bei den Zytokinmessungen ließen sich keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen feststellen.



**Abbildung 49: Die verbesserte Regenerationsfähigkeit, nach einer akuten Kolitis, ist auch bei BPI-BAC+ Tieren nachweisbar.**

Jeweils 5 BL/6J- und BPI-BAC-Männchen, im Alter von 8-12 Wochen, wurde für 7 Tage 1 % DSS im Trinkwasser verabreicht, daran schlossen sich 6 Tage mit normalem Trinkwasser an. Die Tiere wurden täglich gewogen (A). An Tag 13 wurden die Tiere abgetötet, die Darmlänge, von Caecum bis Rektum vermessen und die prozentuale Verkürzung angegeben (B). Die Expression inflammatorischer Zytokine, in den mesenterialen Lymphknoten (D), wurde im Luminex-System vermessen. Die histologische Score (C) wurde aus dem Epithelschaden und dem entzündlichen Infiltrat ermittelt. Dargestellt sind die Mediane aus 2 unabhängigen Experimenten.

Der durch das Fehlen von murinem BPI verursachte Effekt einer verbesserten Regeneration nach einer akuten Kolitis wurde durch das Vorhandensein von humanem BPI noch verstärkt und war auch bei BPI-BAC+ Tieren nachweisbar. Die Unterschiede zwischen den Gruppen traten aufgrund größerer Schwankungen jedoch weniger deutlich hervor. Sowohl die Gewichtsabnahme, als auch die Verkürzung des Darms, war bei Wildtyp-Tieren sichtlich stärker. Der histologische Score hatte sich bei den BPI-BAC+ genau wie zuvor bei den BPI-LBP-BAC+ Tieren auf einen Durchschnittswert von 3 verringert, während die BL/6J-Tier bei



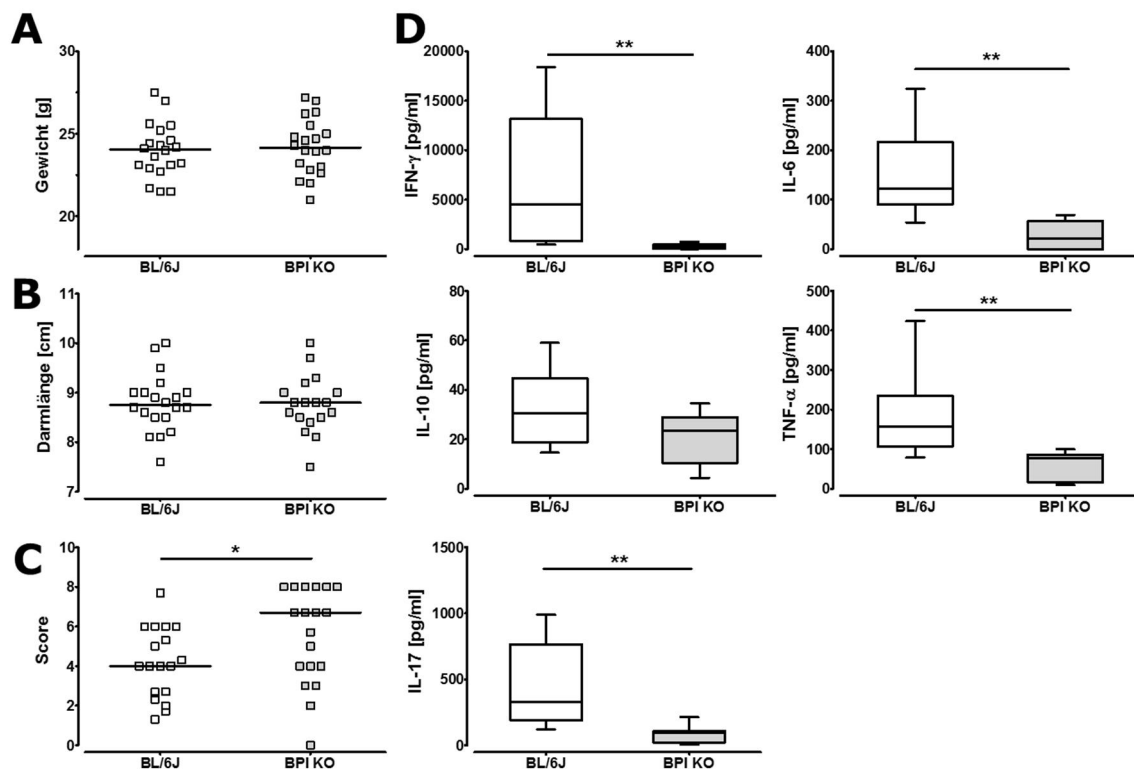
### 3. Ergebnisse

einem Score von 8 lagen. Bei den Zytokinmessungen waren wiederum keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tiergruppen nachweisbar. Abschließend lässt sich festhalten, dass das Vorhandensein von humanem BPI keinen wesentlichen Einfluss hatte. Die nur gering ausgeprägten Effekte des humanen BPI-Transgens in dieser Mauslinie beruhen dabei möglicherweise auf nur einer vergleichsweise sehr geringen Expressionsstärke des humanen BPI in dieser Linie (in Vorarbeiten festgestellt, Daten nicht gezeigt).

### 3. Ergebnisse

#### 3.4.2.3 BPI in der chronischen DSS-induzierten Kolitis

Im nächsten Schritt wurde die Funktion von BPI im Modell der chronischen Kolitis untersucht. Hierfür erhielten die Versuchstiere 4 Zyklen mit 1 % DSS gelöst im Trinkwasser für je 7 Tage. Dazwischen erfolgten jeweils 7 Tage Pause, in denen normales Wasser verabreicht wurde. Nach dem letzten Zyklus wurde erneut für 28 Tage normales Trinkwasser verabreicht. Versuchsende war an Tag 77. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Tiere abgetötet, gewogen und die Darmlänge vermessen. Der histologische Score und die Zytokinproduktion wurden analog zum akuten Modell bestimmt.



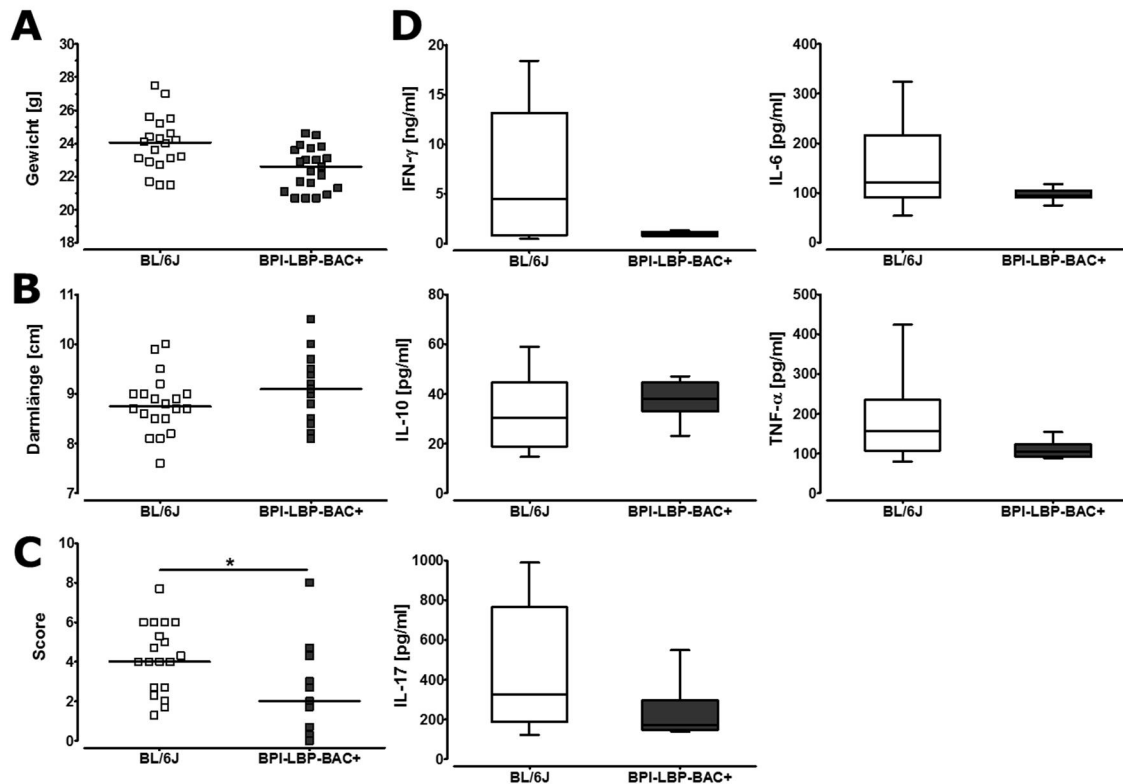
**Abbildung 50: Im Modell der chronischen Kolitis führt das Fehlen von murinem BPI zu einer stärker ausgeprägten Schädigung und Entzündung des Darmepithels.**

Jeweils 10 Weibchen, im Alter von 8-16 Wochen, erhielten zur Induktion der chronischen Kolitis vier Mal je 7 Tage 1 % DSS-haltiges Trinkwasser. Die Behandlungszeiträume waren durch 7-tägige Intervalle mit reinem Trinkwasser unterbrochen, an die letzte DSS-Behandlung schloss sich ein 28-tägiger Zeitraum mit reinem Trinkwasser an. Die Tiere wurden an Tag 77 abgetötet, das Gewicht erfasst (A), die Darmlänge vermessen (B), die Schädigung und Entzündung des Darms mikroskopisch ermittelt (C) und die Zytokinproduktion in den mesenterialen Lymphknoten im Luminex-System detektiert (D). Dargestellt sind die Mediane zweier unabhängiger Experimente. Zur statistischen Auswertung wurde der Mann-Whitney Test angewendet (\*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,0005$ ).

Anhand von Gewicht und Darmlänge waren keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen sichtbar. Bei der Beurteilung des Darmepithels kamen jedoch deutliche Unterschiede zum Vorschein. Im chronischen Zustand wiesen die Wildtyp-Tiere einen mittleren Darmepithel-Schädigungsgrad und Entzündungsscore von 4 auf. Während das

### 3. Ergebnisse

Fehlen von murinem BPI im Modell der akuten Kolitis eine schnellere Regeneration binnen der ersten paar Tage zur Folge hat, war die Funktion im chronischen Modell eine andere. Hier führte die BPI-Defizienz zur anhaltenden drastischen Schädigung des Darmepithels, einhergehend mit einer starken Inflammation. Bei mehr als der Hälfte der untersuchten Tiere war ein Maximalscore von 8 zu verzeichnen. Zudem wurde im Vergleich zu BL/6J-Tieren eine deutlich abgeschwächte Zytokinexpression in den mesenterialen Lymphknoten gemessen. Auch in diesem Modell wurde die Auswirkung von humanem BPI untersucht.



**Abbildung 51: Die Anwesenheit von humanem BPI kann die negativen Auswirkung der BPI-Defizienz kompensieren und führt zu einer verringerten Entzündung und Schädigung des Darmepithels im Modell der chronischen Kolitis.**

Jeweils 10 Weibchen, im Alter von 8-16 Wochen, erhielten zur Induktion der chronischen Kolitis vier Mal je 7 Tage 1 % DSS-haltiges Trinkwasser. Die Behandlungszeiträume waren durch 7-tägige Intervalle mit reinem Trinkwasser unterbrochen, an die letzte DSS-Behandlung schloss sich ein 28-tägiger Zeitraum mit reinem Trinkwasser an. Die Tiere wurden an Tag 77 abgetötet, das Gewicht erfasst (A), die Darmlänge vermessen (B), die Schädigung und Entzündung des Darms mikroskopisch ermittelt (C) und die Zytokinproduktion in den mesenterialen Lymphknoten im Luminex-System detektiert (D). Dargestellt sind die Mediane zweier unabhängiger Experimente. Zur statistischen Auswertung wurde der Mann-Whitney Test angewendet (\* $p < 0,05$ ).

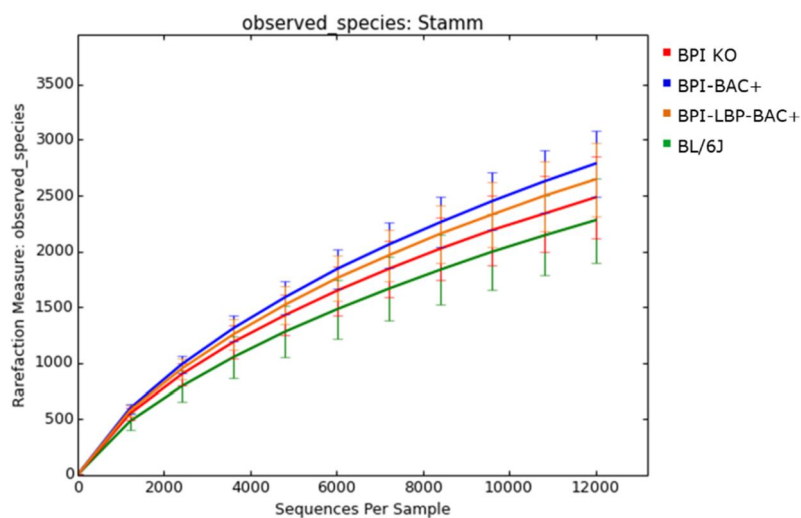
Humanes BPI hatte im Modell der chronischen Kolitis keine Auswirkung auf Gewicht, Darmlänge oder Zytokinproduktion in den mesenterialen Lymphknoten. Bei der histologischen Untersuchung konnte festgestellt werden, dass humanes BPI zu einer verminderten Schädigungsgrad des Darmepithels und einer abgeschwächten Entzündung führte. Mit einzelnen Ausnahmen lag der ermittelte Score bei einem Wert von 2. Im Modell

### 3. Ergebnisse

der akuten Kolitis hatte humanes BPI die positiven Auswirkungen des Fehlens von murinem BPI noch verstärkt. Im Modell der chronischen Kolitis zeigte sich im Unterschied dazu, dass humanes BPI in der Lage ist, die in diesem Fall negativen Folgen, des Fehlens von murinem BPI zu kompensieren und zu einer verbesserten Situation im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen führt.

#### 3.4.3 BPI beeinflusst die Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms

Um den Einfluss von BPI auf die Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms während chronisch entzündlicher Darmerkrankung zu untersuchen, wurde eine *Next-Generation* Mikrobiom-Sequenzierung mit dem GS FLX+ System durchgeführt. Die hier analysierten Proben zeigten den Stand nach Induktion einer chronischen Kolitis (Tag xx nach Beginn der DSS-Applikation). Die erhaltenen Rohdaten zeigten über 900000 und nach Abzug aller Störfaktoren über 700000 Gesamtreads. Die Anzahl war gleichmäßig auf die beiden Stämme verteilt (Daten nicht gezeigt). Zur Qualitätssicherung wurde in einem ersten Schritt ein *Rarefaction*-Plot erstellt.

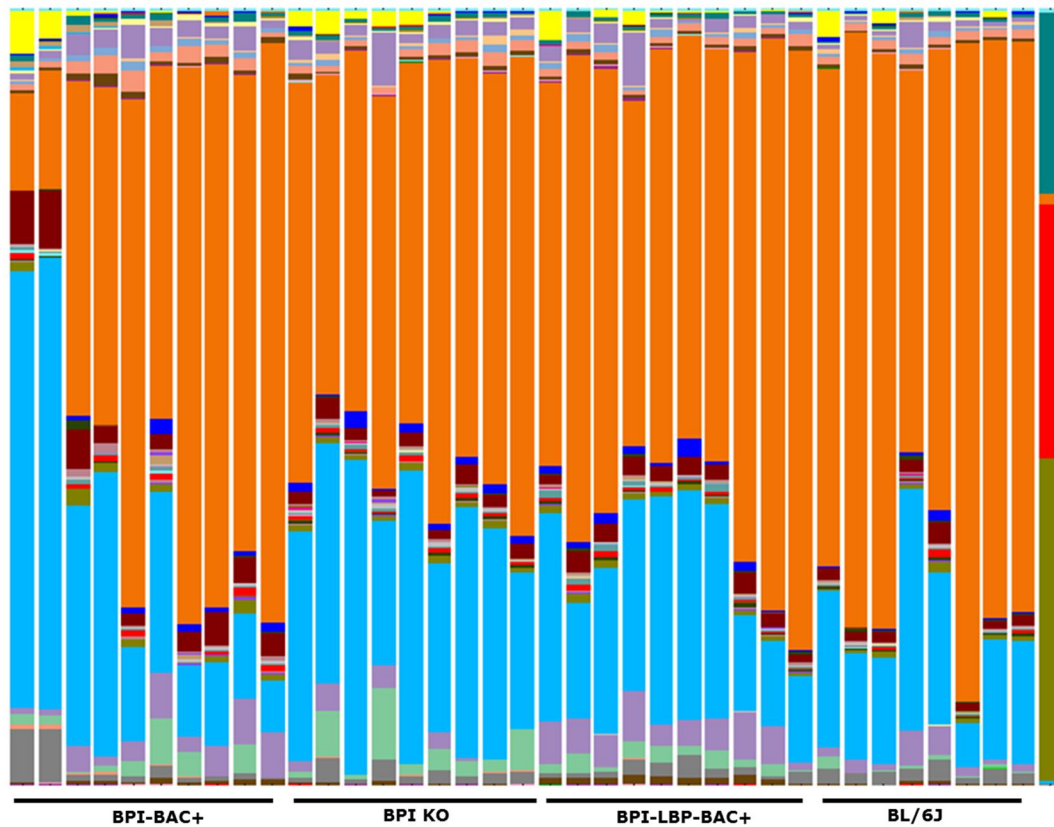


**Abbildung 52: Rarefaction-Kurve der nachgewiesenen Spezies, auf 12000 Sequenzen eingestellt.**

Beide Kurven gehen in eine Sättigung über, somit konnte sichergestellt werden, dass für die Analysen genügend Sequenzen zur Verfügung standen und sich diese zwischen den getesteten Stämmen nicht unterschieden.

Die erhaltenen Kurven gingen für beide Stämme in eine Sättigung über und garantierten somit eine ausreichend hohe Spezieszahl für eine qualitative Untersuchung der Mikrobiomzusammensetzung bei BPI-defizienten oder transgenen Mauslinien, sowie den Kontrolltieren. Um einen ersten Eindruck der relativen Häufigkeit verschiedener Spezies zu erhalten wurde aus den Daten ein *Taxa-Summary-Plot* erstellt.

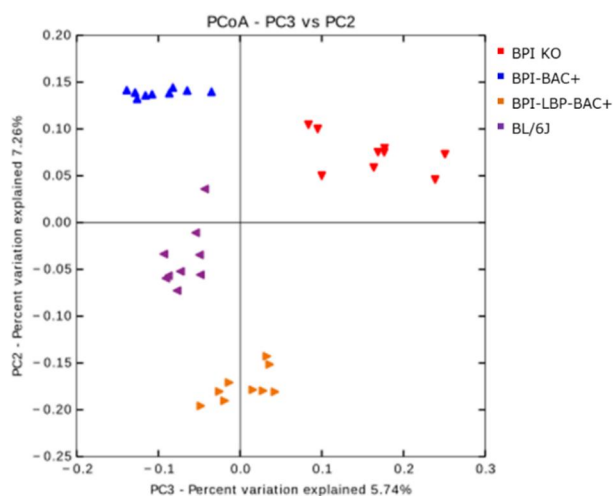
### 3. Ergebnisse



**Abbildung 53: Taxa-Summary-Plot.**

Dargestellt ist die relative Häufigkeit der verschiedenen Taxa auf Genus-Ebene (Details im Anhang). Verglichen wurden die unterschiedlichen BPI-Linien mit Wildtyp-Tieren.

Bei der Verteilung im *Taxa-Summary-Plot* fielen keine eindeutigen Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen auf. Zur weiteren Differenzierung der Mikrobiomkomposition wurde eine *Principal coordinate* Analyse (PCoA) durchgeführt.

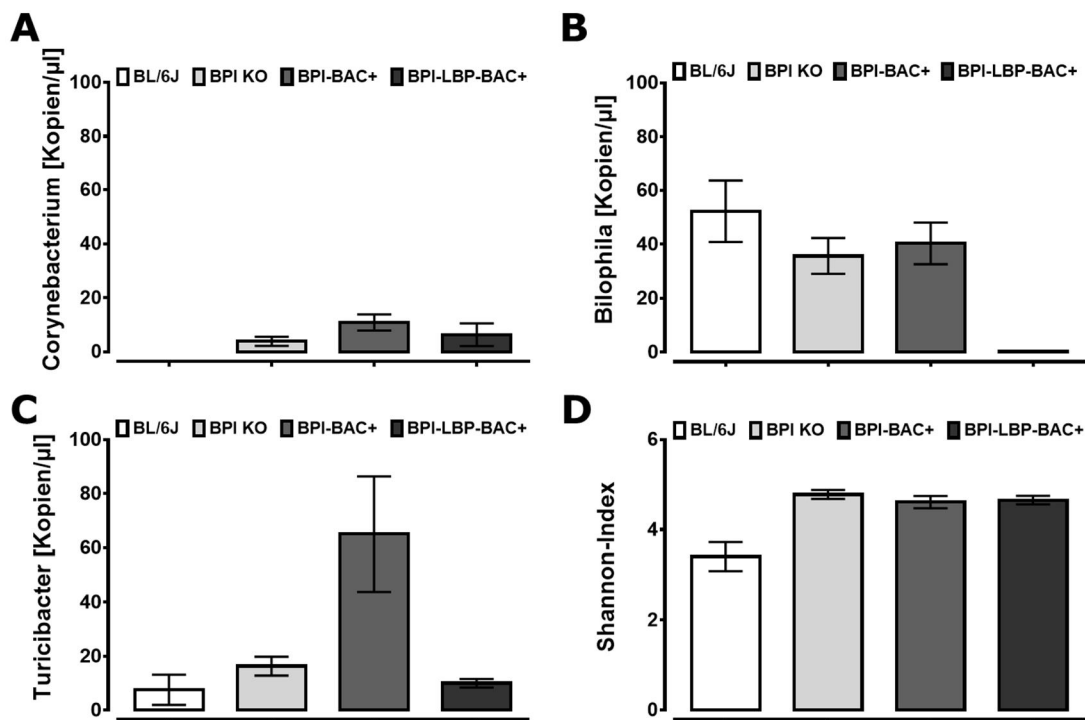


**Abbildung 54: Principal coordinate analysis (PCoA) plot.**

Analysiert für individuelle Tiere, farblich zusammengefasst entsprechend der Mäuslinien. Die Unterschiedliche Zusammensetzung des Darmmikrobioms ist deutlich zu erkennen.

### 3. Ergebnisse

Anhand des PCoA-Plots wurde ersichtlich, dass sich die untersuchten Gruppen deutlich voneinander unterschieden. Da anhand des *Taxa-Summary-Plots* keine offensichtlichen Unterschiede erkennbar waren, wurden die Daten detailliert ausgewertet.



**Abbildung 55: Säulendiagramme anhand der Next Generation Sequencing (NGS) Daten.**

Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM aus einem exemplarischen Versuch mit je 10 Tiere pro Gruppe. Genus *Corynebacterium* fehlt in den Wildtyp-Mäusen C57BL/6J und ist in allen anderen mit ca. 20 Reads vertreten (A). Der Genus *Bilophila* fehlt in der Gruppe BPI-LBP-BAC+ und ist in allen anderen Vorhanden mit ca. 50 Reads (B). *Turicibacter* ist etwas erhöht in der BPI-BAC+ Gruppe (C). Der Shannon-Index wurde in R berechnet und exportiert (D).

Bei detaillierter Betrachtung fielen einige Spezies auf, die zwischen den Gruppen unterschiedlich verteilt waren. Während einige Spezies in einzelnen Gruppen komplett fehlten, traten andere in vermehrter Form auf. Bei Wildtyp-Tieren konnten z.B. keine *Corynebakterien* nachgewiesen werden. Bei den doppelt transgenen Mäusen war hingegen der Genus *Bilophila* kaum detektierbar. *Turicibacter* war bei BPI-BAC+ Tieren leicht erhöht. Ein "*Incertae Sedis*" Genus bei den Clostridiales war verstärkt in der BPI-defizienten Gruppe vorhanden (Daten nicht gezeigt). Der Shannon Diversitätsindex war für die Wildtyp-Gruppe, signifikant erniedrigt, d.h. in den WT Mäusen war die Diversität des Mikrobioms geringer als bei den anderen Gruppen. Murines BPI beeinflusst die Mikrobiomkomposition, insbesondere die Diversität. Die BPI-Defizienz vermindert vermutlich den Selektionsdruck, was zur Vermehrung von, im Wildtyp unterdrückten Spezies führt.

### 4. Diskussion

#### 4.1 Konzentrationsverhältnisse und Expressionsregulation von BPI und LBP

Humanes BPI wird früh während der Myelopoese in großen Mengen, in den Granula neutrophiler Granulozyten<sup>1-3</sup> gespeichert. Als eine der ersten Zellen, die an Infektionsherde rekrutiert werden, sezernieren Neutrophile BPI, welches nicht nur eine direkte Wirkung auf eingedrungene Bakterien hat, sondern zudem die Immunantwort moduliert<sup>4,5</sup>. Hierbei spielt vor Allem das Zusammenspiel mit seinem Antagonisten LBP eine wichtige Rolle. Der genaue Verlauf der Expression von BPI während der Myelopoese, sowie die Regulation bei Entzündungsgeschehen sind nach wie vor kaum beschrieben. Um nähere Einblicke in diese Mechanismen zu erlangen wurde eine für BPI und LBP humanisierte Mauslinie generiert. Anhand der basalen Expressionsmuster von BPI und LBP auf mRNA- und Proteinebene konnte bestätigt werden, dass sich die neu generierte Mauslinie als Modellorganismus zur Untersuchung der Konzentrationsverhältnisse und Expressionsregulation der beiden antagonistisch wirkenden Proteine eignete. Die Expression von humanem BPI erfolgte im Knochenmark. Geringe Mengen fanden sich in der Milz. LBP fand sich mit der höchsten Expressionsrate in der Leber. Zudem konnte das Protein in der Niere und dem Urogenitaltrakt nachgewiesen werden<sup>8</sup>. Die Expression war in weiblichen Organismen<sup>7</sup> höher. Das übereinstimmende Expressionsmuster von transgener Maus und menschlichem Organismus zeigte, dass sich die neu generierte Maus als Modellorganismus zur Aufklärung der Expressionsregulation von BPI und LBP eignen könnte. Ausgehend von den konvergierenden basalen Expressionsmustern, sollte zudem die Expressionsregulation der beiden antagonistischen Proteine bei Entzündungsreaktionen, im zeitlichen Verlauf nach Infektion untersucht werden. Die Wirkung von BPI auf Gramnegative Erreger<sup>9</sup> wurde bereits hinreichend belegt, es gibt aber auch immer mehr Hinweise, dass BPI im Stande ist, Grampositive Erreger abzutöten oder die ausgelöste Immunreaktion zu modulieren. Daher wurden ein Gramnegativer und ein Grampositiver Erreger für die Versuche ausgewählt. Um sowohl lokale als auch systemische Effekte untersuchen zu können, wurde das in der Arbeitsgruppe bereits gut etablierte Modell der akuten Pneumonie verwendet, das sich durch eine starke Infiltration von neutrophilen Granulozyten in die unteren Atemwege auszeichnet. Sowohl aus Serum als auch BAL-Flüssigkeit (BALF) wurde die Proteinmenge an humanem BPI und LBP im Infektionsverlauf mittels Luminex-System bestimmt. Anhand dieses Versuchs konnten erstmals die Konzentrationsverhältnisse der beiden antagonistisch wirkenden Proteine dargestellt werden. Beide Infektionen lösten eine drastische Induktion der Proteine aus, wobei sich der Ort der jeweiligen maximalen Expression deutlich unterschied. Das antibakteriell wirkende BPI wurde in erster Linie lokal

#### 4. Diskussion

exprimiert, während die Expression des LBP-Proteins vorrangig systemisch nachweisbar war. Die unterschiedlichen Konzentrationsverhältnisse von BPI und LBP in der BALF und dem Serum können auf verschiedene Weise erklärt werden. Charakteristisch für das Infektionsgeschehen ist eine massive Einwanderung von neutrophilen Granulozyten<sup>42</sup>. Dies begünstigt eine erhöhte Ausschüttung an BPI am Entzündungsherd. Das antibakteriell wirkende Protein ist in der Lage am Entzündungsort direkt an die Bakterien zu binden<sup>3</sup> und diese zu eliminieren. Dieser Prozess sollte möglichst schnell von statten gehen, was den frühen Anstieg, zwischen 6 und 24 Stunden, nach Erregerkontakt erklärt. Neben seiner direkten Wirkung auf Bakterien kann BPI zudem immunmodulatorische Funktionen übernehmen und vor Ort zur verbesserten Erkennung von Pathogenen, durch Opsonisierung beitragen. Die hauptsächlich lokale Expression von BPI korreliert somit mit der Funktionalität des Proteins. Aus der Kinetik wurde auch der zeitliche Verlauf der Infektion ersichtlich. Nach 48 bis 72 Stunden schien die Infektion abgeklungen zu sein, da kein BPI mehr nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu war in der BALF nur ein geringer Anstieg an LBP zu verzeichnen. Das antagonistisch wirkende Protein<sup>13</sup> wurde hauptsächlich systemisch exprimiert und war in großen Mengen im Serum nachweisbar. Während BPI direkt mit eingedrungenen Bakterien interagieren kann ist die Rolle von LBP auf die Regulation der Immunantwort auf Pathogene begrenzt<sup>10</sup>. Die Expression von LBP erreichte nahezu zum gleichen Zeitpunkt wie BPI ihren Höhepunkt, blieb jedoch im weiteren Verlauf deutlich erhöht. Im Gegensatz zu BPI dessen Expression lokal schnell hoch reguliert wurde und nach 48-72 wieder zum Ausgangswert zurück gekehrt war, wurde LBP systemisch ebenfalls zügig hoch reguliert und blieb über einen längeren Zeitraum konstant. Als Akut-Phase-Protein trägt LBP, mit seiner Fähigkeit Bakterien-LPS zu binden, maßgeblich zur Immunregulation bei. Serumwerte von LBP korrelieren mit dem Ausmaß des entzündlichen Geschehens. Da die Regulation bei Gramnegativen und Grampositiven Erregern analog verlief, ist wahrscheinlich, dass BPI durchaus auch bei Grampositiven Infektionen eine wichtige Rolle spielen könnte. Anhand der zeitlichen und örtlichen Regulation der beiden Proteine könnten sowohl BPI (lokal) als auch LBP (systemisch) als Biomarker für Infektions- bzw. Entzündungsgeschehen eingesetzt werden. Nachdem abgeklärt war, dass die basalen Expressionslevel in der transgenen Maus dem menschlichen System entsprechen und die Regulation der Proteine durch Infektionen möglich ist, sollte die Expression von humanem BPI in neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Im menschlichen Organismus befindet sich BPI vorgespeichert in den Granula der Neutrophilen. Diese zellspezifische Expression sollte nun in der neu generierten Maus überprüft werden. Morphologisch unterschied sich das Blutbild transgener Mäuse nicht von Wildtyp-Tieren. Durchflusszytometrisch konnte jedoch durch intrazelluläre Färbung bestätigt werden, dass humanes BPI in den neutrophilen Granulozyten der transgenen Mäuse vorgespeichert wird. Die Funktionalität der Neutrophilen wurde in *in vitro* getestet. Die wichtigste Voraussetzung für die Wirkung von



#### 4. Diskussion

BPI ist dessen vorherige Freisetzung aus den Granulozyten. Murine Granulozyten sollten mittels verschiedener Stimulanzen zur Sekretion von humanem BPI angeregt werden. Zur Ermittlung der optimalen Versuchsbedingungen erfolgten Vorversuche an humanen Granulozyten. Die Stimulationsbedingungen, die im humanen System zu einer Freisetzung von bis zu 90 % führten waren jedoch in anschließenden Experimenten nicht auf das Maussystem übertragbar. Durch die Einfrier/Auftau-Methode wurde in beiden Systemen der Gesamtgehalt an BPI bestimmt. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass Mausgranulozyten BPI besaßen, der Gesamtgehalt jedoch deutlich niedriger war als bei Humangranulozyten. Die Freisetzung, durch die im humanen System getesteten Bedingungen führte nur zu einer sehr schwachen Sekretion bei murinen Zellen. Des Weiteren schienen Mausgranulozyten deutlich empfindlicher zu sein, da die Freisetzung in unstimulierten Kontrollen deutlich höher war als bei humanen Granulozyten. Insgesamt wurde festgestellt, dass die Granulozyten der transgenen Maus funktionell sind. Sie besitzen die Fähigkeit humanes BPI zu speichern und zu sezernieren. Die Gesamtmenge und die Sekretionseffektivität scheinen sich hingegen vom humanen System zu unterscheiden. Um detaillierte Untersuchungen zur BPI-Expressionsregulation durchführen zu können, ohne langwierige, kostenintensive und ethisch schwer zu rechtfertigende Tierversuche durchführen zu müssen, wurden im Verlauf dieser Arbeit ER-Hoxb8-basierte<sup>6</sup> immortalisierte Stammzelllinien<sup>11</sup> generiert. Die erhaltenen Stammzellen wurden anhand verschiedener Techniken als solche geprüft und mittels Estradiol-Entzug und gleichzeitiger Stimulation mit G-CSF zu neutrophilen Granulozyten differenziert. Zur Untersuchung der Expressionsregulation von BPI wurde die Zelllinie der für BPI und LBP humanisierten Maus verwendet. Vorab wurde die Expression von humanem BPI fluoreszenzmikroskopisch und durchflusszytometrisch abgesichert. Die Versuche zur Freisetzung von BPI aus Granulozyten wurden auf das ER-Hoxb8-System übertragen. Erste Tests zeigten, dass der Gesamtgehalt an BPI in den ER-Hoxb8-Neutrophilen dem des humanen Systems entspricht. Die Stimulationsbedingungen, die bei humanen Granulozyten die besten Ergebnisse erzielten waren jedoch ähnlich wie bereits beim murinen Neutrophilen aus dem Blut nicht auf das ER-Hoxb8-System übertragbar. Auch hier wurde bereits bei unstimulierten Proben eine gewisse Menge an freigesetztem BPI detektiert. Die mittels ER-Hoxb8 generierten Neutrophilen sind in der Lage humanes BPI zu speichern und auch freizusetzen, die optimalen Stimulationsbedingungen müssen in Folgearbeiten erprobt werden. Um höhere BPI-Konzentrationen nach der Stimulation zu erreichen, könnten körpereigene, natürliche Alternativen für die hier erprobten Stimulanzen (Cytochalasin B, fMLP) getestet werden. Zytokine (IL-8) oder Integrine ( $\beta$ 2-Integrin) die an der Neutrophilenaktivierung<sup>12</sup> beteiligt sind stellen hierbei mögliche Alternativen dar, da der Sekretion antimikrobieller Peptide im Organismus zahlreiche Prozesse vorausgehen, die zum *Priming* der Neutrophilen führen und diese erst zur Freisetzung von BPI befähigen.

#### 4. Diskussion

Diese müssten *in vitro* nachgeahmt werden, um Aussagen über die Mechanismen, die der BPI-Sekretion zu Grunde liegen, treffen zu können.

#### 4.2 Die Bedeutung des genetischen Hintergrundes in verschiedenen Mausmodellen

Der auf eine bereits im Jahr 1921 etablierte Maus zurückgehende Mausstamm C57BL/6 hat sich seit der Weitergabe von Zuchttieren von *The Jackson Laboratory* (JAX) an die *National Institutes of Health* (NIH) der USA im Jahr 1951 in zwei große Unterstämme aufgeteilt, C57BL/6J (JAX) und C57BL/6N (NIH). Schon seit längerem war bekannt, dass sich beide Stämme in einer Vielzahl von Eigenschaften unterscheiden. C57BL/6J wird als komplett sequenziertes Labor-Maus-Referenzgenom verwendet, während das *International Knockout Mouse Consortium* (IKMC) und in diesem das *European Conditional Mouse Mutagenesis Program* (EUCOMM) Knockout Mäuse auf Basis von embryonalen Stammzellen (ESZ) aus C57BL/6N generiert. Beide Mausstämme werden parallel in vielen Laboren und Zuchtanstalten weitergezüchtet und teilweise zufällig für Tierexperimente verwendet oder bei der Neugenerierung transgener Mauslinien durchmischt. In einer unlängst erschienen Studie<sup>1</sup> wurden die beiden Unterstämme systematisch sowohl genotypisch als auch phänotypisch verglichen. Dabei wurden 34 *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), 2 Insertionen/Deletionen und 15 Strukturvarianten innerhalb annotierter Gene und auch phänotypisch signifikante Unterschiede detektiert. Diese betreffen zahlreiche physiologische, biochemische sowie Verhaltens- und immunologische Parameter. So zeigten sich beispielsweise nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* unterschiedliche Überlebenskurven und Zytokinmuster. Die Zuchttiere der im Projekt zu verwendenden BPI-defizienten und -transgenen Mauslinien besaßen laut durchgeführter SNP-Analyse einen gemischten Hintergrund mit Anteilen aus beiden C57BL/6-Unterstämmen, weshalb die Linien auf C57BL/6J zurück gezüchtet und regelmäßig anhand von SNP-Analysen kontrolliert wurden. Nichtsdestotrotz sollten sowohl C57BL/6N- als auch C57BL/6J-Mäuse als Kontrollen zur Untersuchung der Rolle von genetischen Unterschieden für die Empfänglichkeit von verschiedenen Mausmodellen eingesetzt werden. Im ersten Abschnitt wurde die Auswirkung des genetischen Hintergrundes auf die Sensibilität in Lungeninfektionsmodellen mit Gramnegativen und -positiven Erregern getestet. In den ausgewählten Pneumoniemodellen wurde die Unerlässlichkeit der korrekten Wahl von Kontrolltieren ersichtlich. Drastische Unterschiede waren im Modell der *P. aeruginosa* induzierten Lungeninfektion zu verzeichnen. C57BL/6J-Mäusen wiesen eine signifikant höhere bakterielle Last im Vergleich zu BL/6N-Mäusen auf. Sowohl in der BALF, als auch im Lungenhomogenat konnte eine, um circa eine Log-Stufe erhöhte Bakterienlast in BL/6J-Tieren nachgewiesen werden. Die vermehrte bakterielle Last korrelierte invers mit der Zahl eingewanderter Leukozyten, die bei der BL/6J-Gruppe nur gering ausfiel. In der

#### 4. Diskussion

Zytokinproduktion zeigten sich nur schwache Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Aus den erhobenen Daten ließe sich ein milderer Infektionsverlauf bei Tieren des Unterstammes BL/6N vermuten. Interessanterweise waren diese Tiere jedoch während des 6-stündigen Infektionsverlaufs klinisch deutlich auffälliger. Die Tiere wiesen offensichtlichere Abweichungen im Spontanverhalten, wie eingeschränkte Motorik bzw. Selbstisolation, Niesen und Konjunktivitis auf. Bei der Präparation der Lunge fielen ebenfalls deutlichere Schädigungen auf. Damit einhergehend fanden sich mehr Erythrozyten in der BALF. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine überschießende oder unkontrollierte Immunantwort in den BL/6N-Tieren sein, bei der die eingewanderten Leukozyten zur Schädigung des Lungenepithels führen. Zudem besteht die Möglichkeit, dass die Bakterien zu dem untersuchten Zeitpunkt bereits aus dem Lungengewebe in den Organismus übergegangen sind. Anhand des klinischen Bildes müsste davon ausgegangen werden, dass BL/6N-Tiere deutlich stärker von der Infektion mit *P. aeruginosa* betroffen waren. Zur genauen Beschreibung wären zusätzlich Versuche, über verschiedene Zeiträume oder die Untersuchung der bakteriellen Last in anderen Organen nötig. Festzuhalten ist die Aussage, dass sich sowohl die Keimlast, als auch die Zahl einwandernder Leukozyten und die daraus resultierende Produktion inflammatorischer Zytokine in den beiden BL/6-Stämmen signifikant unterscheiden. Ob diese Unterschiede auch bei Infektionen mit Grampositiven Erregern auftreten, wurde exemplarisch durch die Infektion mit *S. pneumoniae* getestet. In diesem Versuch lag der Focus zunächst auf der Keimlast und Leukozytenzahl im Verlauf der Infektion von 6, über 24 bis hin zu 48 Stunden nach Erregerkontakt. Auch hier war ein, wenn auch nicht so ausgeprägter, Unterschied im Infektionsverlauf zu erkennen. Die größte Differenz bestand in der Eindämmung bzw. Eliminierung der Bakterien. Während sich die Erreger in den BL/6N-Tieren zunächst vermehrten, aber im Verlauf der Infektion komplett eliminiert wurden, konnte in den BL/6J-Tieren eine anfängliche Vermehrung zwar eingedämmt werden, die endgültige Reduktion der Keimlast war innerhalb des Beobachtungszeitraumes jedoch nicht möglich. Im Vergleich zu dem Biofilm bildenden *P. aeruginosa* waren Pneumokokken mit fortschreitender Infektion nicht mehr im Lungengewebe nachweisbar. Die Zahl an eingewanderten Leukozyten korrelierte auch hier invers mit der Keimlast und war somit früh nach Erregerkontakt in BL/6J-Mäusen signifikant erhöht. Im zeitlichen Verlauf glich sich diese zwischen den beiden Gruppen an. Interessanterweise war auch in diesem Modell ein ähnliches klinisches Bild zu verzeichnen. Trotz geringerer detektierter Unterschiede zeigten BL/6N-Tiere wiederum verstärkte Symptome einer akuten Pneumonie auf. Eine Schädigung des Lungengewebes und eine erhöhte Zahl an Erythrozyten in der BALF fielen auch hier auf. Die schnelle (48 Stunden) und vollständige Eliminierung der Keimlast in der BALF bei BL/6N-Mäusen lässt daher durchaus die Vermutung zu, dass auch hier die Bakterien aus dem Lungengewebe ausgetreten und zu einer systemischen Entzündung geführt haben könnten, was den schlechten Allgemeinzustand der Tiere erklären würde.

#### 4. Diskussion

Zur genauen Aufklärung des Infektionsverlaufs sind lokale (BALF) und systemische (Serum) Zytokinmessungen, sowie eine Bestimmung der Keimlast in verschiedenen Geweben nötig.

Der genetische Hintergrund spielte in den durchgeführten Mausmodellen zur akuten Pneumonie, ausgelöst durch Gramnegative oder Grampositive Erreger eine große Rolle. Noch deutlicher wurde die Auswirkung der genetischen Differenzen der beiden BL/6-Unterstämme im Modell der akuten DSS-induzierten Kolitis. Bislang gab es keine Untersuchungen hierzu. Getestet wurde ebenfalls die Auswirkung des Geschlechts. Hierbei ist zu vermerken, dass sich die akute Kolitis grundsätzlich bei männlichen Tieren stärker manifestierte. Die im Weiteren beschriebenen Unterschiede trafen immer für beide Geschlechter zu. Die akute Kolitis hatte in BL/6N-Mäusen drastischere Auswirkungen. Diese spiegelten sich in einer stärkeren Gewichtsabnahme und Verkürzung des Darms wieder. Bei der histologischen Beurteilung des Colons konnten sichtlich größere Epithelschäden, sowie ein vermehrtes entzündliches Infiltrat festgestellt werden. Diese Daten korrelierten mit der Zytokinproduktion in den mesenterialen Lymphknoten. Alle gemessenen Zytokine waren in der BL/6N-Gruppe signifikant erhöht. Die bakterielle Besiedlung des Verdauungstraktes ist notwendige Voraussetzung für die Entstehung einer intestinalen Entzündung<sup>2-5</sup> zu sein. Dagegen scheint eine physiologische Interaktion mit Bestandteilen der intestinalen Mikrobiota aber auch protektive Effekte auf das intestinale Immunsystem<sup>5-8</sup> zu haben. Auch humane Daten<sup>6,9</sup> liefern zunehmend Hinweise auf die pathogenetisch bedeutende Rolle von darmresidenten Bakterien und bakteriellen Bestandteilen. Um detailliertere Einblicke in die Unterschiede der beiden C57BL/6-Mauslinien zu erhalten wurde eine *Next-Generation* Sequenzierung (NGS) des Darmmikrobioms mit dem GS FLX+ System durchgeführt. Bei der Mikrobiomzusammensetzung fiel im *Taxa-Summary-Plot* eine Spezies besonders auf: Nach Induktion einer akuten Kolitis trat bei BL/6J-Tieren der Genus *Akkermansia* in deutlich höherer Abundanz auf. Dieser Unterschied wurde im Folgenden genauer untersucht. Die Rolle von *A. muciniphila*<sup>10-13</sup> wurde in Literatur bereits mehrfach beschrieben. Interessanterweise zeigte sich in einer Studie<sup>14</sup> eine inverse Korrelation zwischen extrazellulären Vesikeln von *A. muciniphila* und der Schwere der DSS-induzierten Kolitis. Hieraus wird ersichtlich, dass dieses Bakterium eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Homöostase und Immunregulation im Darm spielt. Um herauszufinden, ob eine unterschiedliche Zusammensetzung des Darmmikrobioms, insbesondere die ungleiche Verteilung von *A. muciniphila*, zwischen den beiden BL/6-Mauslinien, für den abweichenden Verlauf der DSS-induzierten Kolitis verantwortlich ist wurden sogenannte *co-housing* Experimente initiiert. Hintergrund des Versuchs war die Annahme, dass sich die Mikrobiomzusammensetzung der beiden Unterstämme, durch die gemeinsame Haltung in einem Käfig angleicht und so die unterschiedliche Auswirkung der Kolitis aufgehoben wird. Bereits die klinischen Daten bestätigten diese Annahme. Es waren keine Unterschiede in der Gewichtsreduktion und Verkürzung des Darms mehr erkennbar. Korrelierend

#### 4. Diskussion

hiermit ließen sich auch histologisch keine stärkere Schädigung des Epithels oder vermehrte Einwanderung an Immunzellen in BL/6N-Mäusen nachweisen. Ebenso waren keine signifikanten Unterschiede mehr bei den Zytokinmessungen in den mesenterialen Lymphknoten mehr vorhanden. Ob hierfür tatsächlich eine Angleichung im Mikrobiom verantwortlich war, wurde mittels qRT-PCR getestet. Wie bereits aus den vorangegangenen Daten zu vermuten war hatte sich die Menge an *Akkermansia* zwischen den beiden BL/6-Mauslinien durch die Haltung in einem Käfig angeglichen. Daraus folgt, dass *Akkermansia muciniphila* einen wahrscheinlichen Kandidaten für den milderen Verlauf der Kolitis darstellt, der durch eine gemeinsame Haltung zwischen einzelnen Mausstämmen übertragbar ist dadurch zu einer Angleichung im Phänotyp der beiden Mauslinien beiträgt.

#### 4.3 Die Rolle von BPI bei akuten Lungeninfektionen

Eine besondere Bedeutung kommt BPI bei der chronischen Atemwegserkrankung Mukoviszidose oder Zystische Fibrose<sup>1-3</sup> (CF, *cystic fibrosis*) zu. Begünstigt durch eine höhere Viskosität des Mukus und einem schlechteren epithelialen Transport in den Atemwegen sind die Lungen von Mukoviszidose-Patienten meist chronisch mit Bakterien der Spezies *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)<sup>4,5</sup> und *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) sowie Hefepilzen kolonisiert. Die Infektion mit *P. aeruginosa*, welche zu einer chronischen Entzündung und Zerstörung des Lungengewebes führt, ist die häufigste Todesursache in diesen Patienten. Charakteristisch für das Infektionsgeschehen ist eine massive Einwanderung von neutrophilen<sup>1,2,6,7</sup> Granulozyten. Somit findet eine erhöhte Ausschüttung von BPI am Entzündungsherd statt. Eine häufige Komplikation bei CF-Patienten ist das Auftreten von Autoantikörpern gegen BPI (BPI-ANCA, *BPI-antineutrophil cytoplasmic autoantibodies*), wobei die Präsenz von BPI-ANCA<sup>2,8-10</sup> sowohl mit der Kolonisation durch *P. aeruginosa* und der Zerstörung des Lungengewebes, als auch mit der Schwere des klinischen Verlaufs korreliert. Dies deutet darauf hin, dass BPI bei der Immunantwort in der Lunge eine entscheidende Rolle spielt. Folglich ist die Rolle von BPI auch für bakterielle Lungeninfektionen, meist verursacht durch Bakterien der Art *Streptococcus pneumoniae*<sup>5</sup> (*S. pneumoniae*), auch Pneumokokken genannt, von besonderem medizinischem Interesse. Als typische Erreger von Lungeninfektionen führen sie weltweit insbesondere bei Kindern, älteren oder immunsupprimierten Menschen zu schwerwiegenden Krankheitsverläufen, welche auch tödlich enden können. Die Wirkung von BPI auf den *P. aeruginosa*- und *S. pneumoniae*-Infektionsverlauf und die Bedeutung von BPI bei der Modulation der Entzündungssituation in der Lunge im Modell der pulmonalen Infektion sollten untersucht werden, um neue Ansatzpunkte für die Behandlung dieser Entzündungs- und Infektionsprozesse aufzudecken, da bislang therapeutische Optionen<sup>3,11</sup> in der Behandlung von chronischen bzw. überschießenden

#### 4. Diskussion

Entzündungsprozessen nach wie vor ausschließlich in der unspezifischen Blockade der Entzündungsabläufe bestehen. Diese Therapien sind jedoch häufig mit ausgeprägten Nebenwirkungen verbunden und führen zu einem erhöhten Risiko für das Auftreten von Sekundärinfektionen. Im ersten Modell wurde die Rolle von BPI bei akuten Lungeninfektionen mit *P. aeruginosa* getestet. Aufgrund der antibakteriellen Wirkung von BPI lag die Vermutung nahe, dass die BPI-defizienten Tiere einen Nachteil bei der Eliminierung der Bakterien aufweisen würden. Dies konnte jedoch nicht bestätigt werden. 6 Stunden nach Erregerkontakt hatten beide Gruppen die Keime gleichermaßen bekämpft. Lediglich die Zellzahl nachgewiesener Leukozyten war leicht erhöht. Ebenso zeigten sich geringfügig höhere Mengen an KC und MIP-2 in den BPI-KO Mäusen, während geringere Mengen an TNF- $\alpha$  nachweisbar waren. Im klinischen Kontext sind beide Größen relevant, da neben einer möglichen systemischen Ausbreitung des Erregers auch die Freisetzung von Zytokinen wesentlich die Prognose eines Patienten beispielsweise im Rahmen einer lokalen Entzündung mit Störung des Gasaustausches oder bei der pneumogenen Sepsis bestimmt. Deutlichere Auswirkungen hingegen hatte das Einbringen von humanem BPI. Dies führte in den transgenen Tieren zu einem Vorteil bei der Bekämpfung der Bakterien. In Korrelation mit der signifikant niedrigeren Zellzahl, wurde eine höhere Zahl eingewanderter Immunzellen in der BALF nachgewiesen. Zudem waren die Zytokine IL-12, MCP-1 und KC erhöht, während weniger MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  und MIP-2 detektiert werden konnte. Die erhaltenen Ergebnisse entsprechen bereits publizierten Daten, in denen dem murinem BPI eine geringere bakterizide Wirkung<sup>12,13</sup> als dem humanen Homolog zugeschrieben wird. Es scheint jedoch trotzdem eine wichtige Rolle bei der Immunmodulation nach Erregerkontakt zu spielen. Während in der gängigen Literatur BPI<sup>14,15</sup> hauptsächlich eine bakterizide Wirkung auf gramnegative Bakterien zugeschrieben wird, konnte in Vorarbeiten durchaus auch eine Wirkung auf grampositive Keime<sup>16</sup> beschrieben werden. Da grampositive Mikroorganismen wie *S. pneumoniae* sich hinsichtlich Erregerbiologie und Pathogenitätsfaktoren grundsätzlich von Gramnegativen, wie *P. aeruginosa* unterscheiden, wurde in einem nächsten Versuch die Wirkung von BPI in einer durch Pneumokokken induzierten Lungeninfektion genauer untersucht. Im ersten Schritt wurde der Verlauf der Infektion über 48 Stunden untersucht. In dem untersuchten Zeitraum waren keine drastischen Auswirkungen zu erkennen. Es gab geringe Unterschiede im Verlauf der Infektion zwischen Wildtypen und BPI-defizienten Tieren, bei welchen 24 Stunden nach Erregerkontakt eine leicht erhöhte Keimlast, Zellzahl und Zytokinproduktion festgestellt wurde. Dies normalisierte sich jedoch im weiteren Verlauf wodurch nach 48 Stunden keine Unterschiede zwischen den Gruppen mehr vorhanden waren. Durch das Einbringen von humanem BPI konnte die Erregerlast gleich zu Beginn besser kontrolliert werden, wodurch es innerhalb der ersten 6 Stunden zu keinem Anstieg der Keimlast kam. Nach 24 Stunden waren auch hier keine nennenswerten Unterschiede mehr zu detektieren. Lediglich beim Abklingen der Infektion, nach 48 Stunden, wurden in den transgenen Tiere

#### 4. Diskussion

nach wie vor erhöhte Zytokinlevel gemessen. Die interessanteste Beobachtung trat bei der der Infektion mit Pneumokokken in einem zweiten Experiment auf. In diesem sollte durch den Vergleich von BPI-defizienten und entsprechenden Kontrollmäusen untersucht werden, ob eine BPI-Defizienz die Bekämpfung pulmonaler Pathogene beeinträchtigt und es dadurch zu einem veränderten klinischen Verlauf und Überleben der Tiere kommt. Hierfür wurden die Mäuse über einen längeren Zeitraum beobachtet. Während der ersten 48 Stunden nach Infektion waren, wie bereits in den vorangegangenen Versuchen keine drastischen Auswirkungen durch das Fehlen von BPI zu verzeichnen. Beide Gruppen zeigten deutliche Symptome einer akuten Lungenentzündung, einhergehend mit einer starken Gewichtsabnahme. Im weiteren Verlauf normalisierte sich bei den Wildtyp-Tieren sowohl der Allgemeinzustand als auch das Körpergewicht, welches nach 168 Stunden wieder das Ausgangsniveau erreicht hatte und stabil blieb. Bei den BPI-defizienten Tieren hingegen trat nach anfänglicher Verbesserung eine erneute und drastische Verschlechterung nach 96 Stunden auf. Ab diesem Zeitpunkt mussten 50 % der Tiere euthanasiert werden. Zur Ursachenfindung wurde die Keimlast in den abgetöteten Tieren lokal, sowie systemisch bestimmt. Hierfür wurden die CFUs aus dem Serum, sowie verschiedenen Organen bestimmt. In allen untersuchten Geweben und auch im Serum konnten Bakterien nachgewiesen werden. Anhand der hier erhobenen Daten wird die Rolle von BPI bei der Abwehr grampositiver Erreger deutlich. Durch das Fehlen von BPI waren die Tiere nicht in der Lage die Erreger vollständig zu bekämpfen. Dies führte zu einer systemischen Ausbreitung und unkontrollierten Vermehrung der Bakterien. Die durchgeführten Versuche zeigten daher erstmalig eine essentielle, nicht redundante Funktion von BPI für die Entzündungsregulation und Erregereliminierung bei einer Pneumonie mit grampositiven Bakterien, was es zu einem möglichen Kandidaten für die Therapie von chronisch infektiösen Lungenerkrankungen macht.

## 4. Diskussion

### 4.4 Die Rolle von BPI bei akuten und chronischen Darmentzündungen

Zweck des Versuchsvorhabens war, die Rolle von BPI bei akuter und chronischer Entzündung des Darms und die Auswirkung auf das intestinale Immunsystems zu verstehen. Bei intestinalen Entzündungsprozessen, wie sie bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) oder auch *inflammatory bowel disease* (IBD)<sup>1-5</sup> genannt, wie Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) auftreten, scheinen nach heutigem Kenntnisstand komplexe Defekte in der Homöostase vorzuliegen, die sich aus einer gestörten Interaktion zwischen dem mukosalen Immunsystem, genetischer Prädisposition und Umweltfaktoren, wie z. B. den normalen intestinalen Bakterien, zusammensetzen. Der Darm gilt als Reservoir von 400 bis 1000 verschiedenen Bakterienspezies. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen manifestieren sich besonders im Ileozökalen- und Rektum-Bereich, wo die bakterielle Dichte am höchsten ist. Im Tiermodell gibt es klare Hinweise für die Bedeutung von luminalen Bakterien für die intestinale Entzündung. Die bakterielle Besiedlung des Verdauungstraktes scheint notwendige Voraussetzung für die Entstehung einer intestinalen Entzündung zu sein. Dagegen scheint eine physiologische Interaktion mit Bestandteilen der intestinalen Bakterien aber auch einen schützenden Effekt auf das intestinale Immunsystem zu haben<sup>6-9</sup>. Auch humane Daten<sup>21-24</sup> liefern zunehmend Hinweise auf die pathogenetisch bedeutende Rolle von darmresidenten Bakterien und bakteriellen Bestandteilen. So konnte gezeigt werden, dass Patienten mit CED eine fehlende immunologische Toleranz gegenüber eigenen Darmbakterien aufweisen, wogegen diese Toleranz bei Gesunden gegeben ist. Die Rolle des *Bactericidal/Permeability-Increasing Protein* (BPI)<sup>1,10,11</sup> bei Infektionen und Entzündungsprozessen im Darm wurde in einem etablierten Entzündungsmodell, der DSS-induzierten Kolitis<sup>15</sup> untersucht. Das DSS-Kolitismodell wurde in der akuten und chronischen Variante angewandt, da sich die beiden Entzündungsarten voneinander unterscheiden. Die akute DSS-Kolitis ist vor allem auf eine Immunantwort des angeborenen Immunsystems auf intestinale Bakterien zurückzuführen. Die chronische Kolitis beruht hingegen auf einem sich selbst unterhaltenden Entzündungsprozess mit starker Beteiligung des adaptiven Immunsystems und hierbei vor allem von T-Zellen. Die der akuten Entzündung folgende Regenerationsphase wurde beobachtet, weil die Bedeutung von BPI in der Restitutionsphase und damit bei der Ausheilung von Darmentzündungen beurteilt werden sollte. Die Ergebnisse sollten sowohl zu einem besseren Verständnis von CED führen, als auch die physiologische Relevanz von BPI hinsichtlich Inflammation und Erregerkontrolle klären, um neue Ansatzpunkte für eine präventive und therapeutische Intervention zu ermöglichen. Zur Beantwortung der Frage, ob BPI an der akuten und chronischen DSS-induzierten Kolitis beteiligt ist, wurden BPI-defiziente und transgene Mäuse mit C57BL/6J-Tieren verglichen. Durch den Vergleich mitunbehandelten Kontrollgruppen wurde



#### 4. Diskussion

überprüft, ob BPI-defiziente und -transgene Mäuse Behandlung ein verändertes intestinales Mikrobiom und dadurch einen anderen klinischen Verlauf aufwiesen. Es wurde vermutet, dass das Fehlen von BPI den Schweregrad der Kolitis bestimmt und durch die geringere Kontrolle der Darmbakterien eine schlechtere Prognose bedingt. Da vor allem im chronischen Verlauf einwandernde Entzündungszellen BPI lokal möglicherweise im Darmgewebe freisetzen, wurde die Bedeutung des Proteins in diesem Modell höher eingeschätzt. Zudem lag die Annahme nahe, dass humanes BPI, durch seine stärkere Wirkung den klinischen Verlauf verbessert und durch das zusätzlich in der transgenen Maus exprimierte LBP zusätzliche Abwehrmechanismen im Darm stimulieren könnte. Den Hypothesen entsprechend zeigten sich im akuten Modell keinerlei Auswirkungen durch die BPI-Defizienz. Menschliches BPI hingegen verbesserte den klinischen Verlauf signifikant. Der histologische Score, lag aufgrund einer schwächeren Epithelschädigung und weniger Infiltrat deutlich niedriger. Im Regenerationsmodell konnte die Rolle von BPI bei der Ausheilung von Darmentzündungen gezeigt werden. Zu diesem Zeitpunkt hatten BPI-defiziente Tiere einen signifikanten Vorteil gegenüber Wildtypen. Das Fehlen von murinem BPI führte zu einem verbesserten klinischen Bild. Die Tiere zeigten geringere Gewichtsabnahmen, Darmverkürzungen und einen niedrigeren histologischen Score. Durch das Vorhandensein von menschlichem BPI wurde der Verlauf der Regeneration noch stärker verbessert. Im Modell der chronischen DSS-induzierten Kolitis zeigte sich ein gegensätzliches Bild. Hier führte die BPI-Defizienz zu einem signifikant verschlechterten Verlauf. In den BPI-defizienten Tieren war das Darmepithel stark beeinträchtigt und großflächig von entzündlichem Infiltrat durchzogen. Menschliches BPI hatte, wie in jedem der bisher getesteten Modelle, wieder positive Folgen. Eine mögliche Erklärung für die gegensätzliche Wirkung von BPI in den unterschiedlichen Modellen könnte die fehlende Kontrolle der Bakterien sein. Die mangelnde Kontrolle hat im frühen Verlauf (akut) noch keinerlei Auswirkung. Da die Kontrolle der Bakterien in unmittelbarem Zusammenhang mit der Immunregulation steht, könnte das Fehlen von BPI in einer schwächer induzierten Immunantwort resultieren. Die stärkere Immunantwort mit ausgeprägteren Inflammationsprozessen in Wildtyp-Tieren könnte dadurch für das schlechtere klinische Bild dieser Gruppe bei der Regeneration ausschlaggebend sein. Langfristig gesehen ist eine gute Immunantwort jedoch nötig, um die Entzündung bekämpfen zu können. So erklärt sich auch der Nachteil durch die BPI-Defizienz im chronischen Modell. In Zusammenschau mit der Chronizität pathologischer Entzündungsprozesse wie Morbus Crohn<sup>16-18</sup> oder Colitis ulcerosa und der damit für die Patienten einhergehenden physischen und psychischen Belastung durch die Erkrankung ist die Entwicklung neuer, besser verträglicher Therapieoptionen<sup>12</sup> unabdingbar. Die hier gewonnenen Daten sprechen dafür, dass sich BPI als möglicher Kandidat zur Therapie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eignet. Um die zugrunde liegenden Ursachen noch detaillierter untersuchen zu können, wurde eine Mikrobiomanalyse<sup>3,19</sup> von C57BL/6J-Tieren im Vergleich mit BPI-defizienten und -

#### 4. Diskussion

transgenen Tieren, mittels NGS, durchgeführt. Die hierbei erhobenen Daten unterstützen die Hypothese, wonach die bakterielle Besiedlung des Verdauungstraktes eine notwendige Voraussetzung für die Entstehung einer intestinalen Entzündung ist. Die Zusammensetzung des Mikrobioms unterschied sich in den Gruppen deutlich voneinander. Dies war besonders in den PCOA-Analysen deutlich zu sehen. Am Auffälligsten war der Unterschied bei der Diversität<sup>13,14</sup>. Diese war bei Tieren der Wildtyp-Gruppe signifikant erniedrigt. Die höhere Diversität bei BPI-defizienten Tieren lässt sich durch den fehlenden Selektionsdruck bei Fehlen dieses antibakteriellen Proteins erklären. Spezies, die in der Regel durch die bakterizide Wirkung von BPI unterdrückt werden können sich nun ungehindert vermehren und ausbreiten. Die Auswertung der NGS- und DSS-Daten zeigt deutlich, wie eng Bakterien und das Immunsystem im Darm zusammenhängen und miteinander interagieren. Da durch die Mikrobiomanalyse bestätigt werden konnte, dass BPI die Zusammensetzung des Darmmikrobioms beeinflusst und die Zusammensetzung des Darmmikrobioms den Verlauf von entzündlichen Darmerkrankungen beeinflusst, ist nach derzeitigen Stand der Erkenntnis BPI ein hochinteressanter neuer Therapiekandidat. Sinnvoll wären weitere detaillierte Untersuchungen zur immunregulatorischen Funktion von BPI. Erste Versuche in der Arbeitsgruppe zeigten bereits eine Stimulation von Dendritischen Zellen (DCs), bei der BPI<sup>12,20</sup> die Zellen stimuliert und somit als Immunverstärker fungieren könnte. Eine verbesserte Aktivierung von DCs könnte in der Folge zu einer gesteigerten T-Zellantwort führen, was vor allem bei chronischen Kolitis die entscheidenden Auswirkungen auf den langfristigen klinischen Verlauf haben könnte.

### 5. Zusammenfassung

Der menschliche Organismus ist täglich einer Vielzahl von schädlichen und krankheitserregenden Einflüssen durch Pilze, Viren, Bakterien oder Toxinen ausgesetzt. Um sich dieser zu erwehren hat sich im Laufe der Evolution das Immunsystem ausgebildet. Bei der Abwehr von potentiellen Krankheitserregern spielen neben den Zellen des Immunsystems die hoch konservierten antimikrobiellen Proteine der angeborenen Immunität eine essentielle Rolle. In dieser Arbeit sollten sowohl Funktion, als auch Expressionsregulation des antimikrobiellen Abwehrproteins *Bactericidal/permeability increasing protein* (BPI) anhand von neu generierten Mausmodellen charakterisiert werden. BPI des Menschen wird im Knochenmark gebildet und hauptsächlich in primären Granula von neutrophilen Granulozyten gespeichert. Eine Expression von humanem BPI konnte in mukosalen Epithelzellen des Verdauungstraktes, der Atemwege und des Urogenitaltraktes nachgewiesen werden. In erster Line ist BPI für seine bakterizide und bakteriostatische Wirkung gegenüber gramnegativen Bakterien bekannt, neuere Arbeiten belegen eine Wirkung auf grampositive Bakterien. Das murine Ortholog wurde erst vor wenigen Jahren entdeckt und wird nur in geringen Mengen konstitutiv exprimiert. Die antiinflammatorische Wirkung der beiden Proteine ist ähnlich, murines BPI zeigt jedoch eine abgeschwächte bakterizide Wirkung. Um die Funktion von BPI detailliert untersuchen zu können wurden BPI-defiziente, für BPI und für BPI und LBP humanisierte Tiere verwendet. Nachdem sowohl *in vitro* als auch *in vivo* abgesichert war, dass die basalen Expressionslevel für BPI und dessen funktionellen Antagonisten LBP in der transgenen Maus dem menschlichen System entsprechen, wurden Versuche zur Expressionsregulation nach Infektion mit gramnegativen und grampositiven Erregern durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine zeitlich und örtlich divergierende Regulation der beiden Proteine, wodurch BPI (lokal) und LBP (systemisch) als Biomarker für Infektions- bzw. Entzündungsgeschehen eingesetzt werden könnten. Um langwierige, kostenintensive und ethisch schwer zu rechtfertigende Tierversuche zu vermeiden, wurden im Verlauf dieser Arbeit erfolgreich ER-Hoxb8-basierte immortalisierte hämatopoetische Stammzelllinien generiert und zu Neutrophilen differenziert, die ein neues geeignetes System für detaillierte Untersuchungen der Expressionsregulation und Funktion von BPI darstellen.

Eine besondere Bedeutung kommt BPI bei der chronischen Atemwegserkrankung Mukoviszidose oder Zystische Fibrose (CF, *cystic fibrosis*) zu. Die Infektion mit *P. aeruginosa* ist die häufigste Todesursache bei diesen Patienten. Charakteristisch für das Infektionsgeschehen ist eine massive Einwanderung von neutrophilen Granulozyten, wodurch eine erhöhte Ausschüttung von BPI am Entzündungsherd stattfindet. Folglich ist die Rolle von BPI auch für bakterielle Lungeninfektionen mit *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) von besonderem medizinischem Interesse. Daher wurde die Wirkung von BPI

## 5. Zusammenfassung

auf den *P. aeruginosa*- und *S. pneumoniae*-Infektionsverlauf, sowie die Bedeutung bei der Modulation der Entzündungssituation in der Lunge im Modell der pulmonalen Infektion untersucht, um neue Ansatzpunkte für die Behandlung dieser Entzündungs- und Infektionsprozesse aufzudecken. Humanes BPI führte in den transgenen Tieren zu einem Vorteil bei der Bekämpfung der Bakterien. Murines BPI zeigte in Übereinstimmung mit vorhandener Literatur eine geringere bakterizide Wirkung, spielte jedoch eine wichtige Rolle bei der Immunmodulation nach Erregerkontakt. Die durchgeführten Versuche zeigten erstmalig eine essentielle, nicht redundante Funktion von BPI für die Entzündungsregulation und Erregereliminierung bei einer Pneumonie mit grampositiven Bakterien, was dieses Protein zu einem möglichen Kandidaten für die Therapie von chronischen infektiösen Lungenerkrankungen macht.

Die Rolle von BPI bei akuter und chronischer Entzündung des Darms und die Auswirkung auf das intestinale Immunsystem waren ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit und wurden im Modell der DSS-induzierten Kolitis untersucht. Bei chronischen Entzündungsprozessen, wie Morbus Crohn (MC) oder Colitis ulcerosa (CU), scheinen nach heutigem Kenntnisstand komplexe Defekte in der Homöostase vorzuliegen, die aus einer gestörten Interaktion zwischen dem mukosalen Immunsystem, genetischer Prädisposition und Umweltfaktoren resultieren. Die erhobenen Daten sprechen dafür, dass sich BPI als möglicher Kandidat zur Therapie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eignet, da sich dessen An- bzw. Abwesenheit auf den Verlauf der Entzündung auswirkt. Während eine BPI-Defizienz zum frühen Zeitpunkt (akut) noch keine Auswirkung hat, zeigt sich in der Anschlussphase (Regeneration) eine positive Wirkung auf den Entzündungsverlauf. Diese hängt vermutlich mit einer abgeschwächten Immunantwort zusammen, welche zu geringerer Entzündung, bzw. Schädigung des Darms führt. Langfristig ist eine effektive Immunantwort zur vollständigen Regeneration des Darmgewebes und zur Erreichung der Homöostase erforderlich, wobei BPI eine wichtige Rolle spielt. Mögliche verantwortliche Ursachen wurden in einer Mikrobiomanalyse mittels NGS ermittelt. Die erhobenen Daten unterstützen die Hypothese, wonach die Komposition der bakteriellen Besiedlung des Verdauungstraktes eine entscheidende Rolle bei der Entstehung intestinaler Entzündungen spielt. BPI-defiziente Tiere wiesen durch den fehlenden Selektionsdruck bei Fehlen dieses antibakteriellen Proteins eine deutlich höhere Diversität auf. Die Mikrobiomanalyse bestätigte dadurch unsere Hypothese, dass BPI die Zusammensetzung des Darmmikrobioms und infolge dessen den Verlauf von entzündlichen Darmerkrankungen beeinflusst. Basierend auf diesen Befunden ist BPI somit ein hochinteressanter neuer Therapiekandidat für die Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.

In einer weiteren Serie von Experimenten wurde die Bedeutung der Mausgenetik für die Ausprägung der Infektions- und Entzündungsmodellen untersucht. Der Mausstamm C57BL/6 hat sich seit der Weitergabe von Zuchttieren von *The Jackson Laboratory* (JAX) an die *National Institutes of Health* (NIH) in zwei Unterstämme aufgeteilt, C57BL/6J (JAX)

## 5. Zusammenfassung

und C57BL/6N (NIH). Seit längerem war bekannt, dass sich beide Stämme in einer Vielzahl von Eigenschaften unterscheiden. Auch in den in dieser Arbeit getesteten Modellen waren drastische Unterschiede zwischen den Unterstämmen zu verzeichnen. BL/6N-Mäuse waren generell stärker von Infektionen oder Entzündungen betroffen. Vor allem bei der *P. aeruginosa*-induzierten Lungeninfektion wiesen diese Inzuchtmäuse eine überschießende Immunantwort bei gleichzeitig schlechterer Erregerkontrolle auf. Im Modell der akuten DSS-induzierten Kolitis wurde ebenfalls ein signifikant schwererer Verlauf bei BL/6N-Tieren festgestellt. Für detaillierte Einblicke wurden Mikrobiomanalysen mittels NGS durchgeführt, die eine unterschiedliche Zusammensetzung des Darmmikrobioms bei den BL/6-Stämmen zeigte. Anhand von sogenannten *co-housing* Experimenten konnte gezeigt werden, dass diese Unterschiede im Darmmikrobiom ursächlich für den divergierenden Verlauf der induzierten Kolitis sind und eine Angleichung der Mikrobiomkomposition in einem identischen Kolitisverlauf resultierte.

## 6. Literatur

1. Hoebe, K, Janssen, E & Beutler, B. The interface between innate and adaptive immunity. *Nature immunology* (2004).
2. Medzhitov, R & Janeway, CA. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current opinion in immunology* (1997).
3. Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **1**, 135–145 (2001).
4. Carroll, MC. The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nature immunology* (2004).
5. JERALA, R. Structural biology of the LPS recognition. *International Journal of Medical Microbiology* **297**, 353363 (2007).
6. Dalpke, A., Lehner, M., Hartung, T. & Heeg, K. Differential effects of CpG-DNA in Toll-like receptor 2/4/9 tolerance and cross-tolerance. *Immunology* **116**, 203–212 (2005).
7. Schumann, R. Function of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) and CD14, the receptor for LPS/LBP complexes: a short review. *Research in Immunology* **143**, 1115 (1992).
8. Akira, S & Hemmi, H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunology letters* (2003).
9. Beutler, B. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Current opinion in immunology* (2000).
10. Montes, AH, Asensi, V, Alvarez, V & Valle, E. The Toll-like receptor 4 (Asp299Gly) polymorphism is a risk factor for Gram-negative and haematogenous osteomyelitis. *Clinical & ...* (2006).
11. Gilmore, T. D. Introduction to NF- B: players, pathways, perspectives. *Oncogene* **25**, 6680–6684 (2006).
12. Brasier, AR. The NF-κB regulatory network. *Cardiovascular toxicology* (2006).
13. Beutler, B. Innate immunity: an overview. *Molecular immunology* (2004).
14. Le, Y, Murphy, PM & Wang, JM. Formyl-peptide receptors revisited. *Trends in immunology* (2002).
15. Moal, L.-L. V. & Servin, AL. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clinical microbiology reviews* (2006).

## 6. Literatur

16. Müller, CA, Autenrieth, IB & Peschel, A. Intestinal epithelial barrier and mucosal immunity. *Cellular and molecular life sciences* (2005).
17. Guaní-Guerra, E., Santos-Mendoza, T., Lugo-Reyes, S. O. & Terán, L. M. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clinical Immunology* **135**, 1–11 (2010).
18. Branche, WC, Young, VM & Robinet, HG. Effect of colicine production on *Escherichia coli* in the normal human intestine. ... *Biology and Medicine* (1963).
19. Zhang, YJ, Li, S, Gan, RY, Zhou, T & Xu, DP. Impacts of gut bacteria on human health and diseases. *International journal of ...* (2015).
20. Vos, W. & Vos, E. Role of the intestinal microbiome in health and disease: from correlation to causation. *Nutr. Rev.* **70**, S45–S56 (2012).
21. Velasquez-Manoff, M. Gut microbiome: the peacekeepers. *Nature* (2015).
22. Scott, KP, Antoine, JM & Midtvedt, T. Manipulating the gut microbiota to maintain health and treat disease. ... *in health and disease* (2015).
23. Weiss, J, Elsbach, P, Olsson, I & Odeberg, H. Purification and characterization of a potent bactericidal and membrane active protein from the granules of human polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Biological Chemistry* (1978).
24. Calafat, J, Janssen, H, Knol, EF, Malm, J & Egesten, A. The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is membrane-associated in azurophil granules of human neutrophils, and relocation occurs upon cellular .... *Apmis* (2000).
25. Canny, G. & Levy, O. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) and BPI homologs at mucosal sites. *Trends Immunol.* **29**, 541–7 (2008).
26. Kleiger, G., Beamer, L., Grothe, R., Mallick, P. & Eisenberg, D. The 1.7 Å crystal structure of BPI: a study of how two dissimilar amino acid sequences can adopt the same fold. *Journal of Molecular Biology* **299**, 10191034 (2000).
27. Beamer, L., Carroll, S. & Eisenberg, D. Crystal Structure of Human BPI and Two Bound Phospholipids at 2.4Å Resolution. *Science* **276**, 18611864 (1997).
28. Huuskonen, J. *et al.* Structure and phospholipid transfer activity of human PLTP: analysis by molecular modeling and site-directed mutagenesis. *J. Lipid Res.* **40**, 1123–30 (1999).
29. Elsbach, P & Weiss, J. The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI), a potent element in host-defense against gramnegative bacteria and lipopolysaccharide. *Immunobiology* (1993).

## 6. Literatur

30. Lennartsson, A., Pieters, K., Vidovic, K. & Gullberg, U. A murine antibacterial ortholog to human bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is expressed in testis, epididymis, and bone marrow. *J. Leukoc. Biol.* **77**, 369–77 (2005).
31. Eckert, M., Wittmann, I., Röllinghoff, M., Gessner, A. & Schnare, M. Endotoxin-induced expression of murine bactericidal permeability/increasing protein is mediated exclusively by toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta-dependent pathways. *J. Immunol.* **176**, 522–8 (2006).
32. Wittmann, I. *et al.* Murine bactericidal/permeability-increasing protein inhibits the endotoxic activity of lipopolysaccharide and gramnegative bacteria. *J. Immunol.* **180**, 7546–52 (2008).
33. Beamer, L., Carroll, S. & Eisenberg, D. The BPI/LBP family of proteins: A structural analysis of conserved regions. *Protein Sci.* **7**, 906–914 (1998).
34. Schumann, R. *et al.* Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* **249**, 1429–31 (1990).
35. Bingle, C. & Craven, C. Meet the relatives: a family of BPI- and LBP-related proteins. *Trends in Immunology* **25**, 5355 (2004).
36. Gutschmann, T. *et al.* Dual Role of Lipopolysaccharide (LPS)-Binding Protein in Neutralization of LPS and Enhancement of LPS-Induced Activation of Mononuclear Cells. *Infection and Immunity* **69**, 6942–6950 (2001).
37. Hartl, D. & Amaral, M. Cystic fibrosis - From basic science to clinical benefit: A review series. *J. Cyst. Fibros.* **14**, 415–416 (2015).
38. Rogers, GB, Carroll, MP & Serisier, DJ. Characterization of bacterial community diversity in cystic fibrosis lung infections by use of 16S ribosomal DNA terminal restriction fragment length polymorphism .... *Journal of clinical* ... (2004).
39. Johansen, H. K. *et al.* Colonisation and infection of the paranasal sinuses in cystic fibrosis patients is accompanied by a reduced PMN response. *J. Cyst. Fibros.* **11**, 525–31 (2012).
40. Craig, A., Mai, J., Cai, S. & Jeyaseelan, S. Neutrophil recruitment to the lungs during bacterial pneumonia. *Infect. Immun.* **77**, 568–75 (2008).
41. Wada, Y., Kuroda, T., Murasawa, A., Nakano, M. & Narita, I. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies against bactericidal/permeability-increasing protein in patients with rheumatoid arthritis and their correlation with bronchial involvement. *Mod Rheumatol* **20**, 252–6 (2010).
42. Dorlöchter, L. *et al.* Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies and lung disease in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* **3**, 179–83 (2004).



## 6. Literatur

43. Carlsson, M. *et al.* Autoantibody response to BPI predict disease severity and outcome in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* **6**, 228–33 (2007).
44. Epstein, FH, Tuomanen, EI & Austrian, R. Pathogenesis of pneumococcal infection. *New England Journal* ... (1995).
45. Holweg, A., Schnare, M. & Gessner, A. The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in the innate defence of the lower airways. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 1045–50 (2011).
46. Hanauer, SB. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflammatory bowel diseases* (2006).
47. Shorter, RG, Huizenga, KA & Spencer, RJ. Inflammatory bowel disease. ... *of digestive diseases* (1972).
48. Swidsinski, A. *et al.* Mucosal flora in inflammatory bowel disease \*. *Gastroenterology* **122**, (2002).
49. Lennard-Jones, JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of* ... (1989).
50. Mecklenburg, I. [Therapy of Inflammatory Bowel Disease]. *Praxis (Bern 1994)* **103**, 203–11 (2014).
51. Canny, G. & McCormick, B. Bacteria in the Intestine, Helpful Residents or Enemies from Within? *Infect. Immun.* **76**, 3360–3373 (2008).
52. Mazmanian, S., Round, J. & Kasper, D. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* **453**, 620–625 (2008).
53. Kang, C. *et al.* Extracellular Vesicles Derived from Gut Microbiota, Especially *Akkermansia muciniphila*, Protect the Progression of Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis. *PLoS ONE* **8**, (2013).
54. Setoyama, H, Imaoka, A, Ishikawa, H & Umesaki, Y. Prevention of gut inflammation by *Bifidobacterium* in dextran sulfate-treated gnotobiotic mice associated with *Bacteroides* strains isolated from ulcerative colitis .... *Microbes and infection* (2003).
55. Monajemi, H. *et al.* Inflammatory bowel disease is associated with increased mucosal levels of bactericidal/permeability-increasing protein. *Gastroenterology* **110**, 733–9 (1996).
56. Akin, H. *et al.* Association between bactericidal/permeability increasing protein (BPI) gene polymorphism (Lys216Glu) and inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* **5**, 14–8 (2011).

## 6. Literatur

57. Kim, J. Antimicrobial Proteins in Intestine and Inflammatory Bowel Diseases. *Intest Res* **12**, 20–33 (2013).
58. MARRA, M., THORNTON, M., SNABLE, J., WILDE, C. & SCOTT, R. Endotoxin-binding and -neutralizing properties of recombinant bactericidal/permeability-increasing protein and monoclonal antibodies HA-1A and E5. *Critical Care Medicine* **22**, 559 (1994).
59. Ooi, C. E., Weiss, J., Doerfler, M. E. & Elsbach, P. Endotoxin-neutralizing properties of the 25 kD N-terminal fragment and a newly isolated 30 kD C-terminal fragment of the 55-60 kD bactericidal/permeability-increasing protein of human neutrophils. *J. Exp. Med.* **174**, 649–55 (1991).
60. Gray, P., Corcorran, A., Eddy, R., Byers, M. & Shows, T. The genes for the lipopolysaccharide binding protein (LBP) and the bactericidal permeability increasing protein (BPI) are encoded in the same region of human chromosome 20. *Genomics* **15**, 188–90 (1993).
61. Simon, M. *et al.* A comparative phenotypic and genomic analysis of C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains. *Genome Biol.* **14**, R82 (2013).
62. Zurita, E. *et al.* Genetic polymorphisms among C57BL/6 mouse inbred strains. *Transgenic Res* **20**, 481–489 (2010).
63. Matsuo, N. *et al.* Behavioral profiles of three C57BL/6 substrains. *Front Behav Neurosci* **4**, 29 (2010).
64. Bryant, C. *et al.* Behavioral Differences among C57BL/6 Substrains: Implications for Transgenic and Knockout Studies. *J Neurogenet* **22**, 315331 (2008).
65. Mekada, K. *et al.* Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Experimental Animals* **58**, 141–149 (2009).
66. Simone, M. *et al.* Host Genetic Background Influences the Response to the Opportunistic *Pseudomonas aeruginosa* Infection Altering Cell-Mediated Immunity and Bacterial Replication. *PLoS ONE* **9**, (2014).
67. Caporaso, G. J. *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods* **7**, 335–336 (2010).
68. Caporaso, JG, Bittinger, K & Bushman, FD. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. ... (2010).
69. Edgar, RC, Haas, BJ, Clemente, JC & Quince, C. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. ... (2011).
70. Edgar, RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* (2010).

## 6. Literatur

71. Pruesse, E, Quast, C, Knittel, K & Fuchs, BM. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic acids ...* (2007).
72. Van Eijk, LT, Dorresteyn, MJ & Smits, P. Gender differences in the innate immune response and vascular reactivity following the administration of endotoxin to human volunteers\*. *Critical care ...* (2007).
73. Haecker, H. Method for generation of conditionally immortalized hematopoietic progenitor cell lines with multiple lineage potential. (2013).
74. Weiss, J. *et al.* Human bactericidal/permeability-increasing protein and a recombinant NH<sub>2</sub>-terminal fragment cause killing of serum-resistant gramnegative bacteria in whole blood and inhibit tumor necrosis factor release induced by the bacteria. *J. Clin. Invest.* **90**, 1122–30 (1992).
75. Iovine, N., Eastvold, J., Elsbach, P., Weiss, J. & Gioannini, T. The Carboxyl-terminal Domain of Closely Related Endotoxin-binding Proteins Determines the Target of Protein-Lipopolysaccharide Complexes. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 7970–7978 (2002).
76. Wang, S. *et al.* Tissue Coexpression of LBP and CD14 mRNA in a Mouse Model of Sepsis. *Journal of Surgical Research* **76**, 6773 (1998).
77. Dentener, M. A., Von Asmuth, E. J., Francot, G. J., Marra, M. N. & Buurman, W. A. Antagonistic effects of lipopolysaccharide binding protein and bactericidal/permeability-increasing protein on lipopolysaccharide-induced cytokine release by mononuclear phagocytes. Competition for binding to lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **151**, 4258–65 (1993).
78. Wang, G. G. *et al.* Quantitative production of macrophages or neutrophils ex vivo using conditional Hoxb8. *Nature methods* **3**, 287–293 (2006).
79. Amulic, B, Cazalet, C & Hayes, GL. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annual review of ...* (2012).
80. Seksik, P. [Gut microbiota and IBD]. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **34 Suppl 1**, S44–51 (2010).
81. Matsuoka, K & Kanai, T. The gut microbiota and inflammatory bowel disease. *Seminars in immunopathology* (2015).
82. Pelloquin, J. M. & Nguyen, D. D. The microbiota and inflammatory bowel disease: insights from animal models. *Anaerobe* **24**, 102–6 (2013).
83. Stecher, B & Hardt, WD. The role of microbiota in infectious disease. *Trends in microbiology* (2008).

## 6. Literatur

84. Faith, J. *et al.* The Long-Term Stability of the Human Gut Microbiota. *Science* **341**, 1237439 (2013).
85. Zhang, H, Sparks, JB, Karyala, SV & Settlage, R. Host adaptive immunity alters gut microbiota. *The ISME journal* (2015).
86. Lei, Y., Nair, L & Alegre, ML. The interplay between the intestinal microbiota and the immune system. *Clinics and research in hepatology and ...* (2015).
87. Passel, M. *et al.* The Genome of *Akkermansia muciniphila*, a Dedicated Intestinal Mucin Degrader, and Its Use in Exploring Intestinal Metagenomes. *PLoS ONE* **6**, (2011).
88. Derrien, M., Vaughan, E. E., Plugge, C. M. & de Vos, W. M. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 1469–76 (2004).
89. Hansson, G. Role of Mucus layers in gut infection and inflammation. *Curr. Opin. Microbiol.* **15**, (2011).
90. Griesenbach, U. & Alton, E. W. F. W. Recent advances in understanding and managing cystic fibrosis transmembrane conductance regulator dysfunction. *F1000Prime Rep* **7**, 64 (2015).
91. Bragonzi, A. *et al.* Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* expresses alginate in the lungs of patients with cystic fibrosis and in a mouse model. *J. Infect. Dis.* **192**, 410–9 (2005).
92. Spitznagel, JK. Antibiotic proteins of human neutrophils. *Journal of Clinical Investigation* (1990).
93. Colgan, S., Ehrentraut, S., Glover, L., Kominsky, D. & Campbell, E. Contributions of neutrophils to resolution of mucosal inflammation. *Immunol. Res.* **55**, 75–82 (2012).
94. Kobayashi, O. Clinical Role of Autoantibody against Bactericidal/Permeability-Increasing Protein in Chronic Airway Infection. *Journal of Infection and Chemotherapy* **4**, 8393 (1998).
95. Walmsley, R. *et al.* Antineutrophil cytoplasm autoantibodies against bactericidal/permeability-increasing protein in inflammatory bowel disease. *Gut* **40**, 105–109 (1997).
96. Bilton, D. A new chapter in therapy for cystic fibrosis. *Lancet Respir Med* (2015).
97. Canny, G. O., Trifonova, R. T., Kindelberger, D. W., Colgan, S. P. & Fichorova, R. N. Expression and function of bactericidal/permeability-increasing protein in human genital tract epithelial cells. *J. Infect. Dis.* **194**, 498–502 (2006).

98. Aichele, D., Schnare, M., Saake, M., Röllinghoff, M. & Gessner, A. Expression and antimicrobial function of bactericidal permeability-increasing protein in cystic fibrosis patients. *Infect. Immun.* **74**, 4708–14 (2006).
99. Kristjánsson, G., Venge, P., Wanders, A., Löf, L. & Hällgren, R. Clinical and subclinical intestinal inflammation assessed by the mucosal patch technique: studies of mucosal neutrophil and eosinophil activation in inflammatory bowel diseases and irritable bowel syndrome. *Gut* **53**, 1806–1812 (2004).
100. Tilg, H & Moschen, AR. Food, immunity, and the microbiome. *Gastroenterology* (2015).
101. Minaev, S. *et al.* The prognostic value of bactericidal/ permeability-increasing protein in infants with congenital pathology of the gastrointestinal tract. *Med. news of the NC* **9**, (2014).
102. Morgan, M. *et al.* New Perspective on Dextran Sodium Sulfate Colitis: Antigen-Specific T Cell Development during Intestinal Inflammation. *PLoS ONE* **8**, (2013).
103. Schaubek, M. *et al.* Dysbiotic gut microbiota causes transmissible Crohn's disease-like ileitis independent of failure in antimicrobial defence. *Gut* (2015).
104. Velde, A. *et al.* Comparative analysis of colonic gene expression of three experimental colitis models mimicking inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **13**, 325–330 (2007).
105. West, CE & Jenmalm, MC. The gut microbiota and its role in the development of allergic disease: a wider perspective. *Clinical & Experimental ...* (2015).
106. Scher, JU, Ubeda, C, Artacho, A & Attur, M. Decreased bacterial diversity characterizes the altered gut microbiota in patients with psoriatic arthritis, resembling dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Arthritis & ...* (2015).
107. Li, J, Butcher, J, Mack, D & Stintzi, A. Functional impacts of the intestinal microbiome in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases* (2015).
108. Manikwar, P., Kiptoo, P., Badawi, A., Büyüktimkin, B. & Siahaan, T. Antigen-specific blocking of CD4-specific immunological synapse formation using BPI and current therapies for autoimmune diseases. *Med Res Rev* **32**, 727–764 (2012).

## 7. Anhang

## 7.1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1: Kristallstruktur von humanem BPI.....</b>	<b>17</b>
<b>Abbildung 2: NGS probenspezifische Multiplex Identifier (MIDs). ....</b>	<b>49</b>
<b>Abbildung 3: Strategie der für BPI und LBP humanisierten Mauslinie (BPI-LBP-BAC-Maus).....</b>	<b>59</b>
<b>Abbildung 4: Die mRNA-Expression von BPI und LBP in der transgenen Maus entspricht dem Expressionsmuster beider Gene im humanen System.....</b>	<b>60</b>
<b>Abbildung 5: Die Protein-Expression von BPI und LBP in der transgenen Maus entspricht dem Expressionsmuster beider Proteine im humanen System. ....</b>	<b>61</b>
<b>Abbildung 6: BPI und LBP zeigen unterschiedliche Regulationsmechanismen im zeitlichen Verlauf nach experimentellen Lungeninfektionen mit gramnegativen und grampositiven Bakterien. ....</b>	<b>63</b>
<b>Abbildung 7: Das Blutbild transgener Mäuse weist im Vergleich zu Wildtypmäusen keine unterschiedlichen Zellmorphologien auf.....</b>	<b>64</b>
<b>Abbildung 8: Humanes BPI wird in neutrophilen Granulozyten transgener Mäuse vorgespeichert. .</b>	<b>65</b>
<b>Abbildung 9: In vitro Freisetzung von BPI-Protein aus humanen neutrophilen Granulozyten im Vollblut.....</b>	<b>66</b>
<b>Abbildung 10: In vitro Freisetzung von BPI-Protein aus murinen neutrophilen Granulozyten. ....</b>	<b>67</b>
<b>Abbildung 11: Schematische Darstellung des Hoxb8-Fusionsproteins. ....</b>	<b>68</b>
<b>Abbildung 12: Mit der Calcium-Phosphat-Transfektion konnte eine hohe Transfektionseffizienz erreicht werden. ....</b>	<b>69</b>
<b>Abbildung 13: Erfolgreiche retrovirale Transduktion von Knochenmarkszellen. ....</b>	<b>69</b>
<b>Abbildung 14: ER-Hoxb8-immortalisierte Stammzellen nach DiffQuik-Färbung.....</b>	<b>70</b>
<b>Abbildung 15: Bei den generierten ER-Hoxb8-Linien handelt es sich um immortalisierte hämatopoetische Stammzellen. ....</b>	<b>70</b>
<b>Abbildung 16: Die generierten Zelllinien konnten durchflusszytometrisch als hämatopoetische Stammzellen identifiziert werden. ....</b>	<b>71</b>
<b>Abbildung 17: Morphologische Dokumentation der Differenzierung von ER-Hoxb8-Stammzellen zu neutrophilen Granulozyten. ....</b>	<b>72</b>
<b>Abbildung 18: Nachweis der Differenzierung zu ER-Hoxb8-Neutrophilen nach G-CSF-Zugabe.....</b>	<b>72</b>
<b>Abbildung 19: Die generierten Zelllinien konnten durchflusszytometrisch als neutrophile Granulozyten identifiziert werden. ....</b>	<b>73</b>
<b>Abbildung 20: Immunfluoreszenz von humanem BPI in ER-Hoxb8-Neutrophile der BPI-LBP-BAC-Linie. ....</b>	<b>74</b>
<b>Abbildung 21: Durchflusszytometrische Analyse von ER-Hoxb8-Neutrophile der BPI-LBP-BAC Linie. ....</b>	<b>75</b>
<b>Abbildung 22: Stimulation von ER-Hoxb8-Neutrophilen mit Cytochalasin B und fMLP. ....</b>	<b>76</b>
<b>Abbildung 23: Targeting-Strategie zur Generierung einer BPI-defizienten Mauslinie. ....</b>	<b>77</b>

## 7. Anhang

Abbildung 24: Im Modell der akuten <i>Pseudomonas aeruginosa</i> induzierten Lungeninfektion zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden BL/6-Mauslinien.....	79
Abbildung 25: Bei der <i>Streptococcus pneumoniae</i> induzierten Lungeninfektion zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden BL/6-Unterstämmen, sowohl bei der Bakterienlast, als auch bei der Zellzahl eingewanderter Leukozyten. ....	80
Abbildung 26: Einfluss von BPI auf die Bakterienelimination und Zellzahl in der BAL nach Infektion mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	82
Abbildung 27: Humanes BPI reduziert die Keimlast effektiver als murines BPI.....	83
Abbildung 28: Nachweis der applizierten Bakterien ( $3 \times 10^6$ CFU <i>S. pneumoniae</i> ) 15 Minuten nach Infektion. ....	84
Abbildung 29: Das Fehlen von murinem BPI führt 6 Stunden nach Infektion zu keinem Nachteil in der Bekämpfung der Bakterien. ....	85
Abbildung 30: BPI-defiziente Mäuse weisen nach 24 Stunden eine signifikant erhöhte Keimlast, Zellzahl und Zytokinproduktion in der BALF auf. ....	86
Abbildung 31: Das Fehlen von murinem BPI wirkt sich nicht negativ auf das Abklingen der Infektion aus. ....	87
Abbildung 32: Nachweis der applizierten Bakterien ( $3 \times 10^6$ CFU <i>S. pneumoniae</i> ) 15 Minuten nach Infektion. ....	88
Abbildung 33: Die für BPI und LBP humanisierten Tiere weisen nach 6 Stunden eine niedrigere Keimlast im Vergleich zu Wildtyp-Tieren auf. ....	89
Abbildung 34: Humanes BPI führt zu keinem verbesserten Infektionsverlauf nach 24 Stunden Infektion mit <i>S. pneumoniae</i> . ....	90
Abbildung 35: 48 Stunden nach Infektion ist in den BPI-LBP-BAC+ Tieren die Expression proinflammatorischer Zytokine gegenüber Kontrolltieren erhöht. ....	91
Abbildung 36: BPI-defiziente Mäuse sind deutlich susceptibler für Infektionen mit Pneumokokken. ....	92
Abbildung 37: Die beiden BL/6 Unterstämmen unterscheiden sich signifikant im Modell der Dextransulfat-induzierten (DSS) Kolitis. ....	93
Abbildung 38: Rarefaction-Kurve der nachgewiesenen Spezies, auf 10000 Sequenzen normiert. ....	94
Abbildung 39: Taxa-Summary-Plot.....	95
Abbildung 40: Principal coordinate analysis (PCoA) plot. ....	96
Abbildung 41: Nachweis von <i>Akkermansia muciniphila</i> mittels NGS und qRT-PCR. ....	96
Abbildung 42: Durch das <i>co-housing</i> wurden die Unterschiede zwischen den beiden BL/6-Unterstämmen aufgehoben. ....	97
Abbildung 43: Die Kopienzahl für <i>Akkermansia muciniphila</i> hat sich nach dem <i>co-housing</i> zwischen den Gruppen angeglichen. ....	98
Abbildung 44: Das Fehlen von murinem BPI wirkt sich nicht auf den Verlauf einer akuten DSS-induzierten Kolitis aus. ....	99
Abbildung 45: Humanes BPI vermindert die Epithelschädigung und Entzündung im Modell der akuten DSS-induzierten Kolitis.....	100

## 7. Anhang

<b>Abbildung 46: Das Fehlen von murinem BPI wirkt sich positiv auf die Regeneration nach einer akuten Kolitis aus.....</b>	<b>101</b>
<b>Abbildung 47: Das Fehlen von murinem BPI in Kombination mit der Anwesenheit von humanem BPI verstärkt den Effekt einer verbesserten Regeneration nach einer akuten Kolitis.....</b>	<b>102</b>
<b>Abbildung 48: Auch die BPI-BAC+ Maus zeigt einen abgeschwächten Verlauf der akuten DSS-induzierten Kolitis. ....</b>	<b>103</b>
<b>Abbildung 49: Die verbesserte Regenerationsfähigkeit, nach einer akuten Kolitis, ist auch bei BPI-BAC+ Tieren nachweisbar.....</b>	<b>104</b>
<b>Abbildung 50: Im Modell der chronischen Kolitis führt das Fehlen von murinem BPI zu einer stärker ausgeprägten Schädigung und Entzündung des Darmepithels.....</b>	<b>106</b>
<b>Abbildung 51: Die Anwesenheit von humanem BPI kann die negativen Auswirkung der BPI-Defizienz kompensieren und führt zu einer verringerten Entzündung und Schädigung des Darmepithels im Modell der chronischen Kolitis. ....</b>	<b>107</b>
<b>Abbildung 52: <i>Rarefaction</i>-Kurve der nachgewiesenen Spezies, auf 12000 Sequenzen eingestellt. ...</b>	<b>108</b>
<b>Abbildung 53: <i>Taxa-Summary-Plot</i>. ....</b>	<b>109</b>
<b>Abbildung 54: <i>Principal coordinate analysis</i> (PCoA) plot. ....</b>	<b>109</b>
<b>Abbildung 55: Säulendiagramme anhand der <i>Next Generation Sequencing</i> (NGS) Daten. ....</b>	<b>110</b>



## 7.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1: Verwendete Antikörper und Konjugate .....</b>	<b>22</b>
<b>Tabelle 2: Arbeitsgeräte .....</b>	<b>23</b>
<b>Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämme .....</b>	<b>25</b>
<b>Tabelle 4: Verwendete Plasmide.....</b>	<b>25</b>
<b>Tabelle 5: Chemikalien.....</b>	<b>25</b>
<b>Tabelle 6: In dieser Arbeit eingesetzte Enzyme.....</b>	<b>27</b>
<b>Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Kits für die Molekularbiologie.....</b>	<b>27</b>
<b>Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete ELISA- Kits.....</b>	<b>28</b>
<b>Tabelle 9: Nährmedien und Zusatzstoffe.....</b>	<b>28</b>
<b>Tabelle 10: Verwendete Oligonukleotide und Sonden.....</b>	<b>29</b>
<b>Tabelle 11: Puffer und Lösungen .....</b>	<b>32</b>
<b>Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete Stimulantien.....</b>	<b>32</b>
<b>Tabelle 13: Verbrauchsmaterialien .....</b>	<b>33</b>
<b>Tabelle 14: Verwendete Mausstämme.....</b>	<b>34</b>
<b>Tabelle 15: Kolitis-Gesamtscore .....</b>	<b>42</b>

### 7.3 Lebenslauf

#### Angaben zur Person

Name: Nicole Bezold  
Geburtstag/-ort: 20.06.1986 in Kötzing  
Familienstand: ledig  
Nationalität: deutsch

#### Schulbildung

1992 - 1996 Grundschule Cham  
1996 - 2005 Josef-von-Fraunhofer Gymnasium Cham  
Abschluss Allgemeine Hochschulreife (Note 2,1)

#### Berufsausbildung

10/2006 - 09/2009 Bachelorstudiengang Biologie Universität Erlangen-Nürnberg  
Fachmodul Mikrobiologie (Note 2,1)  
Fachmodul Pharmazeutische Biologie (Note 2,5)  
Fachmodul Immunologie (Note 2,3)  
Wahlpflichtmodul Humanbiologie (Note 1,3)

Bachelorarbeit angefertigt am Lehrstuhl für Mikrobiologie betreut  
durch Prof. Dr. Andreas Burkovski

Thema: Proteomanalysen und Insertionsmutagenese von  
*Corynebacterium diphtheriae* (Note 1,3)

Abschluss Bachelor of Science B.Sc. (Note 1,3)

10/2009 - 09/2011 Masterstudiengang Zell- und Molekularbiologie Universität Erlangen-Nürnberg  
Kernmodul Zelluläre und Molekulare Biologie (Note 1,8)  
Biologische Mastermodule:  
Genetic Models in Immunobiology (Note 1,7)  
Entwicklungsbiologie II (Note 1,3)  
Mikrobiologie 6 (Note 1,3)  
Nicht-Biologische Mastermodul:  
Molekulare Immunologie und Infektionsimmunologie (Note 1,7)  
Vertiefungsmodul:  
Immunbiologie (Note 1,3)

## 7. Anhang

Masterarbeit angefertigt am Lehrstuhl für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg betreut durch Prof. Dr. Dr. André Gessner

Thema: BPI: Zentrales Abwehrprotein bei bakteriellen Infektionen

(Note 1,5)

Abschluss Master of Science M.Sc.

(Note 1,5)

04/2012 - heute

Promotion an der Universität Regensburg Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

### **Beschäftigung**

10/2011 - heute

Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg  
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dr. Gessner